

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Suscetibilidade Genética Para a Progressão da Doença
Hepática na Hepatite C Crónica
Eixo Renina-Angiotensina**

Carolina Maria Guerrilha Ribeiro

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Professor Doutor Manuel Bicho
Professora Doutora Deodália Dias

Publicações

Congressos

No âmbito do projeto:

- Bicho, M.; Ferreira, J.; Ribeiro, C.; Carvalho, C.; Sarmiento, D.; Serejo F., “Genetics of Renin-Angiotensin Pathways on Metabolic Parameters and on the Severity of Liver Disease in HCV Patients”, Congresso Português de Endocrinologia, 24 a 27 janeiro de 2019 (submetido).

Outras:

- Freitas J.; Carvalho C., Ribeiro C., Sarmiento D., Barbosa A. P., Mascarenhas M. R., Bicho M., “May Polymorphisms of DHFR, CBS and MTHFR Genes Modulate Metabolic and Bone Remodeling Parameters Associated with Reduced Bone Mineral Density?”, Congresso Europeu de Endocrinologia, 19 a 22 de maio de 2018.

- Bicho, M.; Ferreira, J.; Carvalho, C.; Ribeiro, C.; Sarmiento, D.; Barbosa, A. P.; Mascarenhas, M. R., “The Metabolic Impact of Glutathione-S-Transferases Polymorphisms in the Susceptibility for Reduced Bone Mass”, Congresso Português de Endocrinologia, 24 a 27 janeiro de 2019 (submetido).

Agradecimentos

“You can design and create, and build the most wonderful place in the world. But it takes people to make the dream a reality.”

Walt Disney

A elaboração deste trabalho só foi possível graças à colaboração e contributo de diversos intervenientes, que de forma direta ou indireta, me permitiram atingir os objetivos propostos. Não posso, por isso, deixar de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento.

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa agradeço toda a aprendizagem, qualificação e ensino que me foi prestado.

Agradeço ao Professor Doutor Manuel Bicho por me ter aceite neste projeto e pela oportunidade de desenvolver um trabalho numa área do meu interesse. Agradeço a disponibilidade, a sábia transmissão de conhecimentos e toda a ajuda prestada neste meu estudo.

Agradeço à Professora Doutora Deodália Dias pela orientação durante os dois anos de mestrado e por estar sempre disponível para aconselhar e ajudar.

Ao serviço de Gastrenterologia do Hospital de Santa Maria, na pessoa da Professora Doutora Fátima Serejo da consulta de Hepatologia, pelo fornecimento das amostras biológicas.

A todos os colaboradores do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Lisboa agradeço a simpatia e amabilidade com que me acolheram desde o primeiro momento.

À Dra. Joana Ferreira por todo o apoio e dedicação prestados, demonstrando sempre disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas e por ter contribuído de forma essencial para a construção desta dissertação.

À Dra. Carolina por todo o auxílio e atenção concedidos desde o primeiro momento e pela partilha de ideias e conhecimentos. À Dra. Andreia por toda a ajuda e tempo dispensado comigo. À Dra. Márcia, Dra. Rita, Dra. Ana Luísa, Técnica Conceição Afonso, D. Fátima, obrigada por toda ajuda e disponibilidade.

Aos meus colegas de laboratório, Carla e David, obrigada por me proporcionarem sempre um bom ambiente de trabalho. Agradeço o companheirismo e o espírito de entreajuda constante ao longo da realização deste trabalho. À Francisca e Denise também parceiras de laboratório, que acompanharam e fizeram parte de toda esta aventura.

À Sofia, Dani, Rafain e Joana, que têm um papel muito importante na minha vida, obrigada pela vossa amizade e pela fonte inesgotável de energia positiva.

Aos meus pais um profundo agradecimento por todo o esforço e dedicação, por me darem tudo sem nunca pedirem nada em troca e por me ensinarem a ser a pessoa que sou hoje. Obrigada pelos valores que me transmitiram, por todo o amor, motivação, força e apoio incondicional no decurso da minha vida, ajudando-me na concretização dos meus sonhos. Prometo que farei sempre o possível e o impossível para vos deixar orgulhosos. Um obrigado especial à minha mãe, por toda a ajuda, conselhos e por ser sempre um exemplo de inspiração para mim.

Ao meu irmão, amigo de toda a vida, fico grata pelas nossas conversas e por toda a cumplicidade existente entre nós.

À minha tia, uma das mulheres mais especiais da minha vida, por tudo o que já fez por mim e por todo o amor que sempre me demonstrou.

Ao Miguel, por todo o carinho com que me pauta diariamente e por me fazer rir como ninguém, sem ele este caminho teria sido muito diferente. O meu agradecimento por ter estado presente em todos os

momentos em que mais precisei, pela enorme paciência, pela ajuda, apoio constante e, essencialmente, por nunca deixar de me incentivar.

A todos aqui deixo a minha mais sincera gratidão.

Resumo

A infeção causada pelo vírus da hepatite C (HCV) é um problema de saúde global importante e que pode causar morbilidade e mortalidade significativas e provocar hepatite aguda com alta propensão à infeção crónica.

A infeção crónica pelo VHC pode evoluir para doença hepática grave, nomeadamente cirrose e carcinoma hepatocelular. Existem vários fatores de risco para a progressão da doença hepática: fatores do hospedeiro e fatores virais.

A fibrose hepática, que se caracteriza por inflamação progressiva e deposição de componentes da matriz extracelular, é uma resposta comum à doença hepática crónica.

Há cada vez mais evidências que indicam que os fatores genéticos influenciam a história natural das doenças hepáticas.

A fibrose hepática pode ser vista como uma doença na qual múltiplos genes interagem com fatores ambientais. Contudo, nem todas as pessoas expostas a uma mesma causa desenvolvem a doença da mesma maneira.

Um indivíduo pode não nascer com a doença, mas pode estar sujeito a um elevado risco de a adquirir. A isto chama-se predisposição ou suscetibilidade genética.

Na última década, tornou-se claro que o papel da angiotensina II vai muito para além dos efeitos renais e cardiovasculares reconhecidos. A presença de um sistema renina-angiotensina (SRA) autólogo foi demonstrada em quase todos os tecidos do corpo. Vários estudos recentes demonstraram que o sistema renina-angiotensina desempenha um papel fundamental na fibrose hepática.

O objetivo do presente estudo é determinar se os polimorfismos genéticos dos genes que codificam as proteínas do sistema renina-angiotensina influenciam a suscetibilidade à hepatite C crónica e podem levar à progressão da doença hepática (fibrose hepática).

Os polimorfismos apresentados neste estudo e que foram testados são a enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensinogénio (AGT) e o recetor 1 de angiotensina II (AT1). Todos os polimorfismos genéticos estudados são funcionais porque alteram a função / atividade/quantidade de proteína para a qual o gene codifica. Essas alterações refletem-se em mudanças no ciclo renina-angiotensina, traduzindo-se numa variação nos níveis de angiotensina II. Níveis elevados dessa proteína podem estar associados ao desenvolvimento de fibrose hepática ou à progressão da doença para fases mais graves.

Neste trabalho identificaram-se alguns marcadores intermediários, validados noutros estudos, que se podem relacionar com o desenvolvimento e progressão desta patogénese - plaquetas, fosfatase alcalina, AST, ALT, GGT, ferro, ferritina e glicémia. Verificou-se de igual modo que a atividade da ECA se pode relacionar com desenvolvimento e a progressão desta patogénese. Uma maior actividade da ECA na fibrose hepática, pode contribuir para a morbilidade dos doentes nesta situação. Os

indivíduos portadores do genótipo DD poderão apresentar um maior risco de desenvolver doença hepática mais grave.

Para que as pessoas possam fazer escolhas informadas é importante compreender a predisposição genética para a doença e ter conhecimento dos estilos de vida que podem aumentar ou diminuir o potencial para contrair a doença.

PALAVRAS-CHAVE: Hepatite C Crónica; Fibrose Hepática; Suscetibilidade Genética; ECA/AGT/AT1

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major global health problem, and that can result in significant morbidity and mortality and lead to acute hepatitis with a high propensity for chronic infection.

Chronic HCV infection can progress to severe liver disease including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. There are several risk factors for the progression of liver disease: host factors and viral factors.

Hepatic fibrosis, which is characterized by progressive inflammation and deposition of extracellular matrix components, it is a common response to chronic liver disease.

There is increasing evidence that genetic factors influence the natural history of liver disease.

Hepatic fibrosis can be seen as a disease in which multiple gene interact with environmental factors. However, not all people expose to the same cause develop the disease in the same way.

An individual may not be born with the disease but may be at high risk of acquiring it. This is called predisposition or genetic susceptibility.

Over the last decade, it has become clear that the role of angiotensin II extends far beyond recognized renal and cardiovascular effects. The presence of an autologous renin-angiotensin system has been demonstrated in almost all tissues of the body. Several recent studies have demonstrated that the renin –angiotensin system (RAS) plays a key role in hepatic fibrosis.

The aim of the present study is to determine whether genetic polymorphisms of genes encoding Renin-Angiotensin system proteins influence susceptibility to chronic hepatitis C and can lead to the progression of hepatic disease (liver fibrosis).

The polymorphisms presented in this study which were tested are the angiotensin converting enzyme (ACE), angiotensinogen (AGT) and angiotensin II receptor 1 (AT1). All genetic polymorphisms studied are functional because they alter the function / activity / amount of protein for which the gene encodes. These changes are reflected in changes in the Renin-Angiotensin cycle, ultimately translating into a change in angiotensin II levels. Elevated levels of this protein may be associated either to the development of liver fibrosis or to the progression of the disease to more severe stages.

In this work we have identified some intermediate markers, already validated in other studies, that can be related to the development and progression of this pathogenesis - platelets, alkaline phosphatase, AST, ALT, GGT, iron, ferritin and glycemia. It was also found that ACE activity may be related to the development and progression of this pathogenesis. Increased ACE activity in hepatic fibrosis may contribute to the morbidity of patients in this situation. Individuals with the DD genotype may be at increased risk of developing more severe liver disease.

So that people can make informed choices it is important to understand the genetic predisposition to the disease and to be aware of lifestyles that may increase or decrease the potential to get the disease.

KEYWORDS: Chronic Hepatitis C; Hepatic fibrosis; Genetic susceptibility; ACE/AGT/AT1.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Descoberta da Hepatite C	2
1.2. Vírus da Hepatite C	3
1.2.1. Genótipos e <i>quasispecies</i>	3
1.2.2. Organização do genoma e proteínas virais	5
1.2.3. Ciclo de vida	5
1.3. Epidemiologia da Hepatite C	7
1.3.1. Vias de Transmissão	8
1.3.2. Diagnóstico	9
1.3.3. Tratamento	10
1.4. Forma crónica e aguda da doença	12
1.4.1. Fatores de risco de evolução para cronicidade	13
1.5. Doença Hepática - Fibrose Hepática	20
1.6. Metabolismo intermediário e alterações na função hepática	21
1.6.1. Transaminases e fosfatase alcalina	21
1.6.2. Metabolismo do ferro	21
1.6.3. Metabolismo lipídico	23
1.6.4. Metabolismo da glicose	23
1.7. Doença Hepática - Fibrose Hepática	23
1.8. Sistema de Fase Aguda Renina-Angiotensina	25
1.8.1. Gene do Angiotensinogénio (AGT) - T174M e AT-6/GA	27
1.8.2. Gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) - I/D	27
1.8.3. Gene do recetor tipo I da Angiotensina II (AGTR1) - A1166C	28
2. Objetivos	30
3. Materiais e Métodos	31
3.1. Caracterização da População em Estudo	31
3.2. Estudo Genético	35
3.2.1. Extração de DNA genómico	35
3.2.2. Quantificação do DNA extraído e análise do grau de pureza	35
3.2.3. Amplificação de DNA	36
3.2.4. Eletroforese em gel de agarose	38
3.3. Polimorfismos estudados	39
3.3.1. Polimorfismo I/D do gene do ECA	40
3.3.2. Polimorfismo A1166C do gene do AT1	41
3.3.3. Polimorfismo T174M do gene AGT	42
3.3.4. Polimorfismo AT-6 G/A do gene AGT	44
3.4. Determinação da atividade do ECA sérico – Espectrofotometria	46
3.5. Análise Estatística	47
4. Resultados	48

4.1.	Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos estudados	48
4.2.	Relação dos polimorfismos estudados com a susceptibilidade para a HCC	49
4.3.	Relação da actividade do ECA com a HCC	52
4.4.	Relação dos polimorfismos estudados com o grau de fibrose	52
4.5.	Relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos com o grau de fibrose	53
4.6.	Relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos com os diferentes polimorfismos estudados na população com HCC	57
4.6.1.	Relação dos genótipos do Polimorfismo de I/D do gene ECA com os parâmetros bioquímicos	57
4.6.2.	Relação dos genótipos do polimorfismo AGTR1 A1166C com os parâmetros bioquímicos	61
4.6.3.	Relação dos Genótipos do Polimorfismo AGT T174M com os parâmetros bioquímicos	64
4.6.4.	Relação dos genótipos do Polimorfismo AGT AT-6G/A com os parâmetros bioquímicos	68
4.7.	Correlação de Pearson entre parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos	71
5.	Discussão	73
5.1.	Relação de parâmetros bioquímicos com a infeção crónica pelo VHC e o grau de fibrose hepática	73
5.2.	Suscetibilidade Genética para a HCC para a progressão da doença hepática	78
5.2.1.	Polimorfismo I/D do gene do ECA	78
5.2.2.	Polimorfismo A1166C do gene AGTR1	79
5.2.3.	Polimorfismo T174M do gene AGT	79
5.2.4.	Polimorfismo AT-6G/A do gene AGT	79
5.3.	Relação dos parâmetros bioquímicos com os polimorfismos genéticos estudados	80
6.	Conclusão	83
7.	Bibliografia	84
8.	ANEXOS	99

Índice de Figuras

Figura 1.1. - Prevalência de vírus anti-hepatite (A) e distribuição dos genótipos (B) na Europa.	4
Figura 1.2. - Ciclo de replicação do VHC.	6
Figura 1.3. - História natural da infecção pelo VHC.	12
Figura 1.4. - Alterações na arquitetura hepática (A) associada a fibrose hepática avançada (B).	20
Figura 1.5. - Ação da hepcidina no metabolismo do ferro.	22
Figura 1.6. - Taxas de incidência de cancro do fígado de acordo com a distribuição geográfica na Europa.	24
Figura 1.7. - Esquema do sistema renina angiotensina.	25
Figura 1.8. - Representação esquemática das várias ações da angiotensina II em diversos órgãos.	26
Figura 3.1. - Esquema representativo de técnicas aplicadas.	35
Figura 3.2. - Esquema geral dos passos da reação de PCR.	37
Figura 3.3. - Esquema geral da análise de polimorfismos por meio de PCR-RFLP.	37
Figura 3.4. - Esquema representativo da técnica de eletroforese. ^[173]	38
Figura 3.5. - Polimorfismo I/D do gene da ECA: produtos de amplificados por PCR, visualizados em gel de agarose a 2%.	41
Figura 3.6. - Polimorfismo A1166C do gene do AT1: produtos amplificados por PCR-RFLP, visualizados em gel de agarose a 3%.	42
Figura 3.7. - Polimorfismo T174M do gene AGT: produtos amplificados por PCR-RFLP, visualizados em gel de agarose a 3%.	43
Figura 3.8. - Polimorfismo AT-6 G/A do gene AGT: produtos amplificados por PCR-RFLP, visualizados em gel de agarose a 3%.	45
Figura 4.1. - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo I/D do gene ECA: População com HCC versus Controlos.	49
Figura 4.2. - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo A1166C do gene AGTR1: População com HCC versus Controlos.	50
Figura 4.3. - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo T174M do gene AGT: População com HCC versus Controlos.	51
Figura 4.4. - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo A-6G do gene AGT: População com HCC versus Controlos.	51
Figura 5.1. - Correlação dos parâmetros bioquímicos alterados na fibrose hepática e enzimas hepáticas.	77
Figura 5.2. - Correlação dos parâmetros bioquímicos condicionados pelo genótipo e enzimas hepáticas.	78

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. - Características dos vários tipos de vírus de hepatites.	1
Tabela 1.2. - Prevalência mundial de genótipos de VHC.	3
Tabela 1.3. - Fatores de risco comuns e incomuns na transmissão da Hepatite C.	9
Tabela 1.4. - Classes de DAAs e respetivo mecanismo de ação.	11
Tabela 1.5. - Fatores que afetam a história natural da hepatite C crónica.	13
Tabela 1.6. - Quadro resumo dos polimorfismos estudados: via primária, alelo, alteração nucleotídica ou proteica, possível efeito da variação alélica, direção esperada do efeito no risco.	29
Tabela 3.1. - Critérios de inclusão e exclusão.	31
Tabela 3.2. - Características antropométricas, sociodemográficas e bioquímicas (variáveis contínuas)	33
Tabela 3.3. - Características antropométricas, sociodemográficas, bioquímicas e histológicas (variáveis categóricas)	34
Tabela 3.4. - Polimorfismos genéticos estudados, posição no cromossoma e respetiva substituição.	39
Tabela 3.5. - Primers utilizados para amplificação dos fragmentos de interesse e respetivas bandas de amplificação.	39
Tabela 3.6. - Condições de amplificação e composição da reação de PCR para o polimorfismo ECA I/D.	40
Tabela 3.7. - Variantes alélicas obtidas (fragmentos de amplificação), para o polimorfismo ECA I/D.	40
Tabela 3.8. - Condições de amplificação e composição da reação de PCR, para o polimorfismo AT1 A1166C.	41
Tabela 3.9. - Condições utilizadas na determinação dos genótipos das variantes alélicas estudadas por RFLP, para o polimorfismo AT1 A1166C.	41
Tabela 3.10. - Variantes alélicas obtidas (fragmentos de restrição), para o polimorfismo AT1 A1166C.	42
Tabela 3.11. - Condições de amplificação e composição da reação de PCR, para o polimorfismo AGT T174M.	42
Tabela 3.12. - Condições utilizadas na determinação dos genótipos das variantes alélicas estudadas por RFLP, para o polimorfismo AGT T174M.	43
Tabela 3.13. - Variantes alélicas obtidas (fragmentos de restrição), para o polimorfismo AGT T174M	43
Tabela 3.14. - Condições de amplificação e composição da reação de PCR, para o polimorfismo AGT AT-6 G/A.	44
Tabela 3.15. - Condições utilizadas na determinação dos genótipos das variantes alélicas estudadas por RFLP, para o polimorfismo AGT AT-6 G/A.	44
Tabela 3.16. - Variantes alélicas obtidas (fragmentos de restrição), para o polimorfismo AGT AT-6 G/A.	45

Tabela 4.1. - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo I/D do gene ECA na população de controle.	48
Tabela 4.2. - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo A1166C do gene AGTR1 na população de controle.	48
Tabela 4.3. - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo T174M do gene AGT na população de controle.	48
Tabela 4.4. - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo A-6G do gene AGT na população de controle.	48
Tabela 4.5. - Avaliação da associação do polimorfismo I/D do gene ECA com a HCC.	49
Tabela 4.6. - Avaliação da associação do polimorfismo A1166C do gene AGTR1 com a HCC.	49
Tabela 4.7. - Avaliação da associação do polimorfismo T174M do gene AGT com a HCC.	50
Tabela 4.8. - Avaliação da associação do polimorfismo A-6G do gene promotor do AGT com a HCC.	51
Tabela 4.9. - Avaliação da relação do parâmetro Atividade do ECA com a HCC.	52
Tabela 4.10. - Avaliação da relação dos polimorfismos estudados (genótipos) com o grau de fibrose na população com HCC.	52
Tabela 4.11. - Avaliação da relação dos polimorfismos estudados (genótipos agrupados) na variação do grau de fibrose na população com HCC.	53
Tabela 4.12. - Avaliação da relação dos antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) e o grau de fibrose na população com HCC.	54
Tabela 4.13. - Avaliação da relação dos antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) e o grau de fibrose na população com HCC.	56
Tabela 4.14. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) com os genótipos (II ou ID versus DD) do gene ECA na população com HCC.	58
Tabela 4.15. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) do gene ECA na população com HCC.	59
Tabela 4.16. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) com os genótipos (II ou ID versus DD) do gene ECA na população com HCC.	60
Tabela 4.17. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) com os genótipos (CC ou AC versus AA) do gene AGTR1 na população com HCC.	62
Tabela 4.18. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) do gene AGTR1 na população com HCC.	63
Tabela 4.19. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) com os genótipos (TT ou CT versus CC) do polimorfismo AGT T174M na população com HCC.	65
Tabela 4.20. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) do polimorfismo AGT T174M na população com HCC.	66

Tabela 4.21. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) com os genótipos (CT ou TT versus CC) do polimorfismo AGT T174M na população com HCC. 67

Tabela 4.22. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) com os genótipos do polimorfismo AGT AT-6G/A na população com HCC. 68

Tabela 4.23. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) estudados com os genótipos (AA ou GA versus GG) do polimorfismo AGT AT-6G/A na população com HCC. 69

Tabela 4.24. - Avaliação dos valores médios dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (contínuas) nos diferentes genótipos do polimorfismo AGT AT-6G/A na população com HCC. 70

Tabela 4.25. - Correlação de Pearson entre parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) para a população com HCC. 71

Tabela 5.1. - Estudos que investigam o polimorfismo I/D do gene ECA e/ou os níveis de ECA sérico associados com a fibrose hepática, em populações com HCC. 81

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ac-SDKP	<i>N</i> -acetil-seril-aspartil-lisil-prolina
AgHBc	Antigénio do Core
AgHBe	Antigénio de Replicação Viral
AgHBs	Antigénio de Superfície do Vírus da Hepatite B
AGT	Angiotensinogénio
AGTR1	Gene do receptor tipo 1 da Angiotensina II
AGTR2	Gene do receptor tipo 2 da Angiotensina II
ALT	Alanina Transaminase ou Transaminase Glutâmica Pirúvica
Ang. I	Angiotensina I
Ang. II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Anti-HBc	Anticorpo Total para o Antigénio HBc
Anti-Hbe	Anticorpo para o Antigénio HBe
Anti-HBs	Anticorpo para o Antigénio HBs
Anti-VHC	Anticorpos para o Vírus da Hepatite C
Anti-VHD	Anticorpos para o Vírus da Hepatite D
APOA1	Apolipoproteína A1
APOB	Apolipoproteína B
AST	Aspartato Transaminase ou Transaminase Glutâmica Oxaloacética
AT1	Recetor da Angiotensina II tipo 1
AT2	Recetor da Angiotensina II tipo 2
BH	Biópsia Hepática
BRA	Bloqueadores dos Receptores da Angiotensina
c33c	Proteína recombinante do Vírus da Hepatite C
c100-3	Antigénio do Vírus da Hepatite C
CB1	Receptor canabinóide tipo 1
CB2	Receptor canabinóide tipo 2
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CHLN	Centro Hospitalar Lisboa Norte
CK	Células de Kupffer
DAAs	Antivirais de Ação Direta (<i>direct-acting antivirals</i>)
dL	Decilitro

DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
E2	Estradiol
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ECA II	Enzima Conversora da Angiotensina II
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
ET	Elastografia Transitória
FA	Fosfatase Alcalina
FAPGG	<i>Furylacryloyl-Phenylalanyl-Glycyl-Glycine</i>
g	Gramma
GGT	Gama-glutamyl-transpeptidase
HC	Hepatite C
HCC	Hepatite C Crónica
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HOMA	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
HSCs	Células Hepáticas Estreladas
HSM	Hospital de Santa Maria
IECA	Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina
IFNs	Interferões
IFN-α	Interferão α
IL28B	Interleucina 28B
IMC	Índice de Massa Corporal
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
Kg	Quilograma
L	Litro
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
MEC	Matriz Extracelular
m²	Metro quadrado
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm³	Milímetro cúbico
mM	Milimolar
NAFLD	<i>Non-alcoholic Fatty Liver Disease</i>
NANB	Hepatite pós-transfusional não-A, não-B

ng	Nanograma
NS2	<i>Non-structural Protein 2</i>
NS3	<i>Non-structural Protein 3</i>
NS4A	<i>Non-structural Protein 4 A</i>
NS4B	<i>Non-structural Protein 4 B</i>
NS5A	<i>Non-structural Protein 5 A</i>
NS5B	<i>Non-structural Protein 5 B</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open-Reading Frame</i>
p7	Proteína p7
pb	Pares de Bases Nucleotídicas
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pmol	Picomol
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RI	Resistência à Insulina
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RVB	Ribavirina
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
SLI	<i>Stem-Loop 1</i>
SLII	<i>Stem-Loop 2</i>
SLIII	<i>Stem-Loop 3</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleótido Único (<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>)
SNS	Serviço Nacional de Saúde
SOD	Superóxido Dismutase
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
THC	Δ -9-tetrahidrocanabinol
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
U	Unidades
UTR	<i>Untranslated Regions</i>
UV	Ultra-violeta
VHA	Vírus da Hepatite A

VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VHD	Vírus da Hepatite D
VHE	Vírus da Hepatite E
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>)
µL	Microlitro

1. Introdução

O fígado é um órgão vital que processa os nutrientes, filtra o sangue e combate as infecções. Estas funções podem ficar afetadas, se o fígado se encontrar inflamado ou danificado ^[1]. Uma vez que se encontra em constante exposição a antigénios alimentares e microbianos, requer um estado de tolerância imunológica relativa da qual, em termos evolutivos, os agentes patogénicos como o vírus da hepatite, bactérias e parasitas têm tirado proveito ^[2].

As hepatites virais apresentam-se como um dos principais flagelos para a vida humana. A distinção dos vários tipos de hepatite surgiu somente após a segunda guerra mundial. Este reconhecimento permitiu alcançar marcos importantes que revolucionaram a medicina e a saúde pública ^[3].

As hepatites são caracterizadas como inflamações do tecido celular hepático, causadas mais frequentemente por uma infeção viral. Existem cinco principais vírus de hepatite, designados por: tipo A, B, C, D e E (Tabela 1.1.). Existe ainda um outro tipo de vírus, o G; contudo ainda não é certo se este vírus causa hepatite. Estes 5 tipos são os que motivam maior preocupação devido ao peso da doença, às mortes que provocam e ao potencial para originarem surtos e propagarem epidemias ^[4,5,6].

Tabela 1.1. - Características dos vários tipos de vírus de hepatites.

Características	Hepatite A	Hepatite B	Hepatite C	Hepatite D	Hepatite E
Agente	VAH	VHB	VHC	VHD	VHE
Data de Identificação	1973	1965	1989	1977	1980
Tamanho da Partícula Viral	27 nm	42 nm	50-60 nm	35-37 nm	33 nm
Genoma	RNA	DNA	RNA	RNA	RNA
Propagação	Fecal-Oral	Parentérica	Parentérica	Parentérica	Água contaminada
Período de Incubação	15-45 dias	30-180 dias	20-90 dias	30-50 dias	15-60 dias
Antigénios	VHA	AgHBs AgHBc AgHBe	VHC RNA C 100-3 C 33c	AgHBs VHD	VHE
Anticorpos	anti-VHA	anti-HBs anti-HBc anti-HBe	anti-VHC	anti-HBs anti-VHD	

Adaptado de Saha S. et al. (2016) ^[6]

1.1. Descoberta da Hepatite C

Na década de 60 e início dos anos 70, a hepatite viral compreendia duas doenças clínicas e epidemiologicamente distintas: hepatite infecciosa e sérica [7].

A hepatite infecciosa, ou hepatite A, caracterizava-se por um curto período de incubação (1-3 semanas), transmissão fecal-oral, um alto grau de contagiosidade e uma doença que podia ser prolongada e grave (e até fatal) mas que não originava hepatite crónica ou cirrose.

A hepatite sérica ou hepatite B, em contrapartida, caracterizava-se por um longo período de incubação (1-3 meses), transmissão parenteral ou sexual, um baixo grau de contagiosidade e doença aguda, que poderia ser grave ou fatal e podia originar infeção crónica, hepatite crónica ou até mesmo cirrose [7].

Durante anos, a hepatite viral foi considerada como sendo causada principalmente por um ou dois vírus hepatotrópicos, o vírus A (hepatite infecciosa) ou o vírus B (hepatite sérica). Ocasionalmente, infeções com o vírus *Epstein Barr* (mononucleose infecciosa) e o citomegalovírus também podiam resultar em inflamação hepática [8].

No entanto, estudos de hepatite viral associados à transfusão e à identificação de antígenos e anticorpos especificamente relacionados com as hepatites virais dos tipos A e B tornaram possível o reconhecimento de uma terceira causa de hepatite viral humana [8].

Esta nova entidade clínica definida apenas pelo aumento dos níveis de ALT (alanina transaminase) e a exclusão sorológica de VHA (vírus da hepatite A) e VHB (vírus da hepatite B), foi designada por Hepatite não-A, não-B (NANB). Foi escolhida esta nomenclatura porque, à época, ainda não tinha sido demonstrado que o agente considerado era um vírus transmissível, e nem era conhecido o número de agentes potenciais de hepatite NANB. Estudos posteriores indicaram que o agente NANB era transmissível pelo sangue, capaz de ocorrer em série e de tamanho compatível a uma origem viral [9].

Não foi identificado nenhum antígeno, anticorpo ou sistema de cultura celular específico para a hepatite NANB, e esta falta de “controlo” molecular limitou o progresso na identificação do (s) agente (s) causadores da hepatite NANB [10].

Estudos soro-epidemiológicos revelaram que o vírus não-A, não-B foi disseminado a nível global, predominantemente por exposição através de partilha de agulhas e dispositivos de drogas e representou um grande desafio para a saúde pública, e nenhuma região geográfica foi poupada às suas consequências crónicas. [9].

Após sucessivos estudos de biologia molecular, Qui-Lim-Choo, George Kuo, Daniel Bradley e Michael Houghton e depois de vários anos de investigação, em 1989, identificaram finalmente o genoma do agente viral responsável por 80 a 90% das hepatites pós-transfusionais NANB. Este agente foi denominado de hepatite C (HC) [11].

1.2. Vírus da Hepatite C

O VHC (vírus da Hepatite C) é um vírus do género Hepacivirus, pertencente à família *Flaviviridae*, que também inclui flavivírus clássicos, como febre amarela e dengue [12,13,14]. O vírus apresenta um diâmetro de aproximadamente 50-60 nm e é composto por um envelope (derivado de membranas de células hospedeiras), duas glicoproteínas virais, E1 e E2, e uma nucleocápside icosaédrica que contém no seu interior a proteína do core, que protege o genoma viral [15,16].

1.2.1. Genótipos e *quasispecies*

Este vírus é classificado com base em sete genótipos principais (1,2,3,5,6 e 7), que se encontram divididos em vários subtipos (a, b, c, d, etc.) [17,18]. O genoma completo dos genótipos difere em cerca de 30% na sua sequência de nucleotídeos, enquanto que os de subtipos dentro de um determinado genótipo diferem tipicamente em 15 a 25 por cento [15,17]. Estes genótipos representam as diferenças em relação à distribuição, transmissão e progressão da doença em todo o mundo [18].

A prevalência dos genótipos do VHC é variável nas diferentes regiões do mundo e entre os distintos grupos de uma comunidade (Tabela 1.2.).

Tabela 1.2. - Prevalência mundial de genótipos de VHC.

Países	Prevalência de Genótipo
Norte da Europa e Estados Unidos	G1a
América, Europa e Itália	G2a, G2b, G2c
Índia, Nepal e Paquistão	G3, G3a
África e Médio Oriente	G4
África do Sul	G5
Hong Kong e Sudeste Asiático	G6

Adaptado de Nouroz F. (2015) [19]

O genótipo 1 é o mais comum em todo o mundo e diz respeito a 83,4 milhões de casos (42,6% do total de casos de VHC), dos quais cerca de 1/3 estão presentes na Ásia Oriental. Depois do genótipo 1, o genótipo 3 é o mais comum e inclui 54,3 milhões de casos (30,1% dos casos de VHC). Os genótipos 2, 4 e 6 são responsáveis por um total de 22,8% do total dos casos, enquanto que o genótipo 5 inclui a percentagem restante (>1%). Na maioria dos países, o genótipo 1 e 3 são os mais predominantes comparativamente com os outros, ao passo que o genótipo 4 e 5 prevalecem em países menos desenvolvidos [19].

Concretamente em relação à Europa consideram-se as três áreas principais:

- Central;
- Oriental;
- Ocidental.

O genótipo predominante é o genótipo 1 (64,4%), seguido pelo 3 (25,5%), 2 (5,5%) e 4 (3,7%). Mencionam-se apenas pequenas percentagens de G5, G6 e genótipos misturados ou não classificados [20].

A distribuição de genótipos não mostra alta variabilidade entre as 3 macro áreas principais, variando entre 70,0% (Europa Central), 68,1% (Europa Oriental) e 55,1% (Europa Ocidental) para o genótipo 1; 29,0% (Europa Ocidental), 26,6% (Europa Oriental) e 21,0% (Europa Central) para o genótipo 3. O genótipo 2 parece ter uma maior predominância na Europa Ocidental (8,9%), se comparado com a Oriental (4,3%) ou Central (3,2%). Já o genótipo 4 está sobretudo presente na área Central e Ocidental (4,9% e 5,8%, respetivamente). Apenas são relatados alguns casos de G5 e G6 e principalmente na área Ocidental (Figura 1.1.) [20].

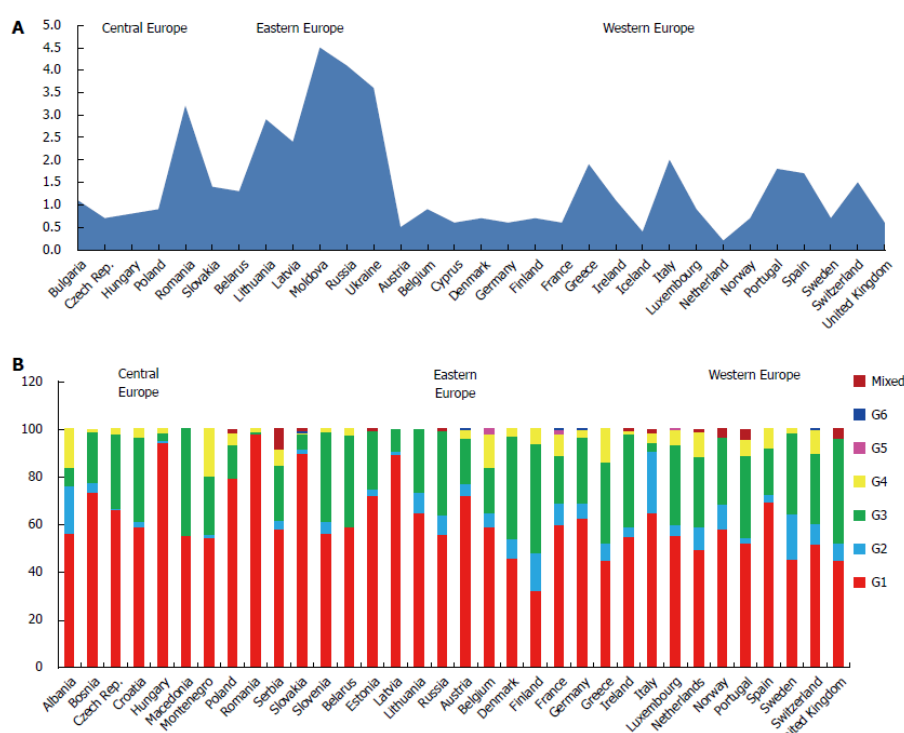


Figura 1.1. - Prevalência de vírus anti-hepatite (A) e distribuição dos genótipos (B) na Europa.
Fonte: PetruzzIELLO A. et al. (2016) [20]

O tipo de vírus mais frequente em Portugal é o 1b, responsável por cerca de metade das hepatites C e o que mais afeta as pessoas que foram contaminadas através de uma transfusão sanguínea. O genótipo 3a é comum nos toxicodependentes intravenosos que são normalmente doentes mais jovens e que adquiriram a infeção há menos tempo. Nos últimos 3-5 anos tem-se assistido a um aumento da frequência do genótipo 4 em Portugal e, nalgumas zonas atinge já os 10-12% [21].

A infeção pelo genótipo 3 do VHC está associada a uma progressão mais rápida da fibrose, a um maior grau de esteatose, e a uma maior incidência de cirrose e carcinoma hepatocelular. A resolução espontânea é observada mais frequentemente na infeção pelo genótipo 1 do VHC, ainda que, se os doentes permanecerem positivos ao RNA (ácido ribonucleico) do VHC, a doença progride de forma mais agressiva. Os genótipos 1 e 4 estão associados a taxas inferiores de resposta e a uma maior duração

do tratamento, em resposta à terapia combinada de IFNs (interferões) e RBV (ribavirina) em comparação com os genótipos 2 e 3 ^[22].

Mutações virais ocorrem espontaneamente com o tempo e em resposta à pressão imune do hospedeiro, formam-se grupos virais geneticamente distintos chamados *quasispecies*. O VHC transporta o gene para a RNA polimerase NS5B (*non-structural protein 5B*) dependente de RNA no seu genoma. A polimerase não tem atividade de revisão e, em resultado, o VHC tem uma alta taxa de erro, o que leva à heterogeneidade genética e à formação destas mutações ^[23].

Acredita-se que existem milhões de *quasispecies* de VHC, diferentes em todas as pessoas infectadas com hepatite C, que são únicos para qualquer pessoa devido à resposta imune de cada indivíduo ao vírus. As *quasispecies* podem ter um papel importante na progressão da doença e na resposta à terapêutica, contudo ainda são necessários mais estudos para melhor perceber o papel das *quasispecies* ^[24].

1.2.2. Organização do genoma e proteínas virais

O genoma do VHC de cadeia simples e polaridade positiva, tem aproximadamente 9600 nucleótidos ^[25]. Para além disso, tem uma única grelha de leitura (*ORF – Open Reading Frame*), que codifica uma poliproteína de cerca de 3000 aminoácidos, quando esta é clivada por enzimas virais ou do hospedeiro, origina 10 proteínas virais, três estruturais (core, E1, E2) e sete não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), esta estrutura é flanqueada por duas regiões não traduzidas (*UTR - Untranslated Regions*), 5'UTR e 3'UTR, necessárias para a tradução e replicação do genoma ^[26-29].

A região 5'UTR é uma estrutura altamente conservada, que tem cerca de 341 nucleótidos. A sua estrutura secundária contém quatro domínios distintos (*stem-loops*) numerados de I a IV, que constituem um local interno de entrada do ribossoma (*Internal Ribosomal Entry Site - IRES*), este é responsável pela iniciação da tradução da poliproteína viral ^[16,18,27]. A região 3'UTR tem aproximadamente 200 nucleótidos, constituída por três domínios: uma sequência polyU/UC com cerca de 80 nucleótidos, uma região variável e uma região altamente conservada, com cerca de 98 nucleótidos constituída por 3 *stem-loops* (3'SLI, 3'SLII e 3'SLIII) ^[18].

O VHC circula de várias formas no hospedeiro infetado, pode ser associado a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que parecem representar a fração infecciosa, e também pode circular ligado a imunoglobulinas e na forma livre ^[30].

1.2.3. Ciclo de vida

Este vírus replica-se no citoplasma dos hepatócitos, mas não é diretamente citopático ^[31]. Apesar das células dos hepatócitos serem as principais células alvo do VHC, também pode ocorrer infeção em células β , células dendríticas e noutro tipo de células ^[30]. A infeção persistente depende da rápida produção do vírus e disseminação contínua de célula para célula, juntamente com a falta de uma forte resposta imune por parte células-T aos antígenos do VHC ^[31].

A infecção pela VHC é um processo altamente dinâmico com uma semi-vida viral de poucas horas (2-3 horas). Estima-se que sejam produzidos e libertados entre 10^{10} a 10^{12} viriões por dia num determinado indivíduo ^[25,31].

O ciclo de vida do VHC pode ser dividido em cinco etapas: entrada viral, tradução, replicação, montagem da partícula viral e libertação de novos vírus (Figura 1.2.) ^[32]. Cada uma das etapas requer a interação do vírus com o hospedeiro, para permitir que o vírus estabeleça uma infeção crónica ^[32].

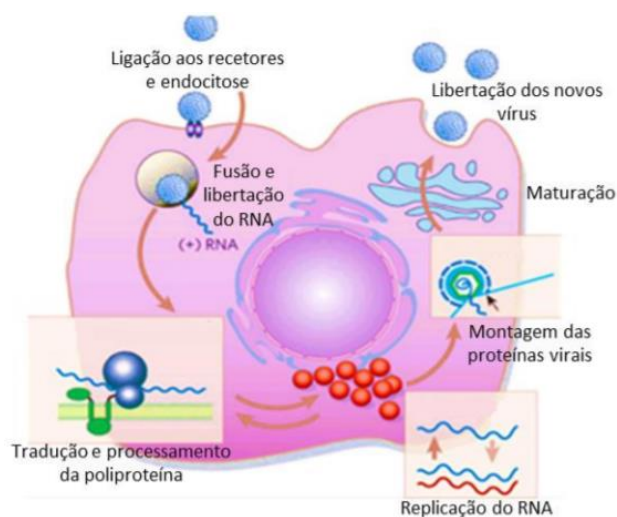


Figura 1.2. - Ciclo de replicação do VHC.

Adaptado de Lindenbach B. D. et al. (2005) ^[33]

1.3. Epidemiologia da Hepatite C

O VHC é uma das maiores causas de morte e morbidade a nível mundial devido à rápida progressão da doença que é caracterizada por uma inflamação do fígado causada por um vírus ^[20,21].

A hepatite C é um vírus oncogénico de preocupação internacional crescente em termos de saúde pública. Coloca um grande ónus sobre os sistemas de saúde locais e setores económicos, porque é uma das principais causas de cirrose, carcinoma hepatocelular e transplantes de fígado em todo o mundo. Além disso, o VHC é uma das principais causas de morte relacionadas com o fígado, causando mais de 670 000 mortes por ano, número que deverá continuar a aumentar ^[34].

A maioria das apresentações de epidemiologia global do VHC assenta muito em estudos de prevalência do VHC. Estes estudos são tipicamente de desenho transversal e são feitos em populações selecionadas – por exemplo, dadores de sangue, ou doentes com doença hepática crónica – que não são representativos da comunidade ou região onde residem. Estudos baseados em população representativa de toda uma comunidade são muito mais úteis, mas este tipo de estudo não é viável em muitas partes do mundo ^[35].

À escala mundial, estima-se que 3% da população do planeta, o equivalente a 170-180 milhões de pessoas, vivem com infeção causada pelo VHC ^[36]. Aproximadamente 70% - 80% dos indivíduos gravemente infetados pelo VHC desenvolverão doença hepática crónica, e dentro de 10 a 30 anos, aproximadamente 20% deles sofrerão de cirrose e complicações daí resultantes, das quais 1% a 5% são carcinoma hepatocelular (CHC) em cada ano ^[36]. O elevado consumo de álcool, particularmente em mulheres, a idade e a coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), podem estar associados a uma progressão mais rápida da doença hepática, especialmente a fibrose ^[37].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que pelo menos 71 milhões de pessoas estão persistentemente infetadas com VHC ^[38]. Só nos EUA, as mortes relacionadas com o VHC excederam as mortes por VIH durante mais de uma década. As mortes relacionadas com o VHC estão a aumentar em todo o mundo, enquanto que a mortalidade relacionada com o VIH está a diminuir de acordo com a OMS ^[38].

A incidência e a prevalência do VHC diminuíram recentemente na América do Norte e na Europa Ocidental ^[39].

As altas taxas de prevalência são referidas em relação a muitos países em vias de desenvolvimento. O Sul da Ásia tem taxas altas de infeção pelo VHC. Na África subsariana há fortes indícios de que também existe uma elevada taxa de prevalência, nomeadamente nos Camarões (13,8%), Burundi (11,3%), Gabão (9,2%), Uganda (6,6%), Guiné (5,5%) e Gana (3%) ^[39]. O Egito tem uma prevalência registada de cerca de 22% e é a mais alta do mundo.

Na Europa Ocidental, a população infetada pelo vírus da hepatite C é estimada em aproximadamente 5 milhões, com um desnível que varia de 0,5% no norte da Europa a 2% nos países do Mediterrâneo. A prevalência é ainda maior na Europa Oriental ^[40].

O padrão epidemiológico da infecção pelo VHC em Portugal não está ainda bem caracterizado [40].

No que concerne a população portuguesa calcula-se uma prevalência de aproximadamente 1-1,5% (100.000 a 150.000 doentes infetados pelo VHC), tendo por base os dados de prevalência em dadores de sangue e utilizadores de drogas por via endovenosa. Destes, assume-se que apenas 30% se encontrem diagnosticados, correspondendo a aproximadamente 37.500 doentes [12].

A distribuição dos doentes diagnosticados pelas diferentes fases de desenvolvimento da doença foi também caracterizada e verifica-se que a grande maioria deles se encontra atualmente com hepatite C crónica (HCC) (60%), estando os restantes distribuídos pelos estádios de cirrose hepática compensada (30%), descompensada (6%) e CHC (4%) [12].

1.3.1. Vias de Transmissão

A via parenteral é a fonte primordial de disseminação da hepatite C. Antes de o VHC ser descoberto e terem surgido os testes biológicos, a infecção por hepatite C causada por transfusão de sangue, hemoderivados e doação de sangue era incomensurável (Tabela 1.3.) [41].

Desde a introdução de testes de triagem do sangue no início dos anos 90, a infecção pelo VHC relacionada com a transfusão é rara. A literatura sobre os fatores de risco para a infecção pelo VHC indica que o uso de drogas injetáveis é agora o principal modo de transmissão [42].

A população prisional é um grupo de alto risco para contrair infeções pelo VHC. São particularmente afetados, uma vez que estão em maior risco, devido ao uso de tatuagens, *piercings* e uso de drogas injetáveis. Além disso, o baixo nível de escolaridade, a falta de conhecimento sobre a hepatite C, os inúmeros e longos períodos de prisão são igualmente fatores associados à maior ocorrência da infecção [43].

Nos países em vias de desenvolvimento, a transmissão nosocomial do VHC por meio da reutilização de seringas e agulhas contaminadas ou inadequadamente esterilizadas, usadas em procedimentos médicos, paramédicos e odontológicos, continua a ser uma importante fonte de infecção pelo VHC e coloca o público nessas áreas sob risco elevado [44].

A transmissão pode ainda ocorrer por via sexual ou de mãe para filho; estes dois últimos casos não são tão frequentes.

O VHC pode ser transmitido de mãe para filho durante a gravidez e no parto [45]. A transmissão materno-infantil (vertical) é a principal via de infecção pelo HCV na infância, o risco de transmissão é mais alto entre as mulheres com alta carga viral no parto (2–6%) e aquelas co-infectadas pelo VIH [46].

A forma como o VHC é transmitido por atividade sexual e em que circunstâncias é um dos aspetos mais controversos da epidemiologia da hepatite C. A evidência epidemiológica existente indica que o VHC pode ser transmitido por via sexual com um parceiro infetado, presumivelmente pela exposição da mucosa a sangue infetado ou a fluidos derivados de soro [47].

Tabela 1.3. - Fatores de risco comuns e incomuns na transmissão da Hepatite C.

Fatores de Risco	Fatores de Risco Incomuns
Uso de drogas por via intravenosa	Uso de cocaína por via intranasal
Transfusões de sangue realizadas antes de 1992	<i>Body piercing</i>
Punção acidental com agulhas infetadas	Tatuagens
Transmissão perinatal	Artigos de barbear partilhado
Hemofilia	Atividade sexual
Hemodiálise	Erosão das articulações dos pugilistas
Transplantes realizados antes de 1992	Transmissão de trabalhadores da área da saúde para doentes

Adaptado de Villena E. Z. (2006) ^[48]

1.3.2. Diagnóstico

Os testes de diagnóstico têm um papel fundamental na análise da infeção, na decisão da terapêutica a tomar e na provável avaliação da resposta virológica à terapia. É importante que haja um diagnóstico para prevenir a progressão da doença e a sua disseminação.

O diagnóstico da HC pode basear-se em duas categorias de testes laboratoriais: diretos e indiretos.

Os testes indiretos baseiam-se em testes sorológicos para deteção de anticorpos específicos para o VHC. Os testes diretos podem detetar, quantificar ou caracterizar os componentes das partículas virais do VHC, como o RNA do VHC e o antígeno do núcleo ^[49].

O controlo da HCC depende grandemente da fase da fibrose hepática, uma vez que é muito importante para a tomada de decisão do tratamento e prognóstico da doença. A biopsia hepática (BH) continua a ser o método padrão mais aceite para definir a fase da fibrose ^[50].

A BH fornece informações sobre o grau (grau de inflamação que reflete a lesão da doença hepática em curso) e a fase (quantidade de fibrose presentemente estabelecida) ^[51].

No entanto, a BH é um procedimento invasivo com várias falhas (variabilidade intra e inter observador da interpretação histopatológica, erros de amostragem, custo elevado) e o risco de complicações raras, mas que caso ocorram podem ser potencialmente fatais ^[52].

A Elastografia Transitória (ET) (*Fibroscan*) é um método imagiológico que pode medir a elasticidade e rigidez hepática, que fornece uma avaliação não invasiva rápida e indolor da gravidade da fibrose ^[53].

O princípio básico da ET é: a velocidade de propagação de uma onda através de um tecido homogêneo é proporcional à sua elasticidade, e corresponde à quantidade de fibrose no fígado ^[54]. Quanto mais duro o tecido, mais rapidamente a onda de corte se propaga ^[55].

A rigidez hepática medida pelo *FibroScan* está relacionada com o estágio de fibrose hepática avaliado histologicamente em pacientes com hepatite B ou C. Pode ser usado para detetar com precisão fibrose hepática inicial, fibrose avançada e cirrose. ^[56].

A fibrose é classificada de acordo com a escala METAVIR:

- **F1** – Fibrose inicial;
- **F2** – Fibrose intermediária;
- **F3** – Fibrose avançada;
- **F4** – Fibrose hepática (cirrose).

1.3.3. Tratamento

O objetivo do tratamento é prevenir complicações da infecção do VHC, conseguido principalmente pela erradicação da infecção ^[57].

A erradicação do vírus diminui o risco de cirrose, descompensação e CHC ao mesmo tempo que melhora as doenças associadas e até mesmo a mortalidade (relacionadas com o fígado e com outras causas) ^[58].

A resposta virológica sustentada (RVS) é o objetivo fundamental do tratamento e é definida como o RNA do VHC indetetável (ou abaixo do limite mais baixo de quantificação) entre 12 e 24 semanas após a suspensão do tratamento ^[59].

Até muito recentemente, o tratamento para a hepatite C incluía o uso de interferão- α (IFN- α) e ribavirina (RVB), que resultou em taxas de cura modestas e reações adversas pouco significativas ^[60].

Esta terapia dual produziu taxas de cura entre 70% e 80% para os genótipos 2 e 3 do VHC, e 45%–60% para os genótipos 1 e 4 ^[61].

Nos últimos anos, o cenário de tratamento da hepatite C experimentou ondas sucessivas de descobertas revolucionárias, graças ao aumento da compreensão da biologia de replicação do VHC e da identificação de proteínas que bloqueiam as principais etapas. Atualmente é dominada por terapias de alto desempenho que englobam uma nova geração de antivirais de ação direta (DAAs - *direct-acting antivirals*) ^[62,63].

Os DAAs são moléculas que têm como alvo proteínas não estruturais específicas do vírus, resultando na rutura da replicação viral e dessa forma da infecção ^[64].

Os DAAs podem bloquear a atividade das enzimas virais visando tanto a serina protease NS3/4A, que bloqueia o processamento da poliproteína como a replicação do VHC.

Outra abordagem centra-se no uso de inibidores de nucleosídeo/nucleotídeo e não-nucleosídeo da polimerase dependente de RNA e inibidores da proteína viral NS5A (*non-structural protein 5A*), que tem um papel regulador na reprodução do VHC ^[65].

Existem quatro classes de DAAs que visam os vários estágios no ciclo de vida do VHC (Tabela 1.4.) ^[66].

Tabela 1.4. - Classes de DAAs e respetivo mecanismo de ação.

Classe	Mecanismo de Ação	Exemplos de DAAs
Inibidores da protease NS3 (<i>non-structural protein 3</i>) /4A (<i>non-structural protein 4A</i>)	Impedem a libertação de proteínas que são essenciais para a replicação viral	Glecaprevir Grazoprevir Paritaprevir Simeprevir Voxilaprevir
Inibidores da polimerase NS5B nucleosídeos	Param a replicação do VHC ao inserirem-se no vírus enquanto este se desenvolve	Sofosbuvir
Inibidores da polimerase NS5B não nucleosídeos	Alteram a forma e inibem a função da enzima polimerase do VHC	Dasabuvir
Inibidores da proteína NS5A	Impedem a replicação do VHC através de múltiplos mecanismos, bloqueando tanto a síntese viral dentro das células infetadas assim como a montagem e libertação de viriões do VHC	Daclatasvir Elbasvir Ledipasvir Ombitasvir Pibrentasvir Velpatasvir

Adaptado de Unitaid (2017) ^[66]

A combinação de DAAs resulta numa alta RVS (> 95%) e reduz a duração do tratamento entre 8 a 12 semanas. Estes tratamentos têm um perfil de segurança adequado e boa tolerabilidade ^[67].

As principais desvantagens da terapia de DAAs incluem os elevados custos de tratamento e a sua incapacidade para prevenir uma re-infecção – especialmente em populações de alto risco, tais como os que usam drogas intravenosas. Investigadores acreditam que a solução a longo prazo estará numa vacina para prevenir o VHC ^[68].

Em Portugal os doentes com hepatite C têm disponível no Serviço Nacional de Saúde (SNS) um novo medicamento para tratamento de todos os genótipos da hepatite C. O relatório de avaliação prévia do Infarmed – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde indica que o novo medicamento (Glecaprevir + Pibrentasvir), do laboratório AbbVie, está indicado para o tratamento da infeção pelos vírus da hepatite C crónica em adultos ^[69].

De acordo com o Infarmed, trata-se de um medicamento que permite uma cura mais rápida, de apenas oito semanas e para todos os doentes (todos os genótipos), evitando assim que o doente tenha de se sujeitar a exames de diagnósticos complementares. Até agora estavam disponíveis no mercado sete medicamentos "de última geração" para o tratamento da hepatite C ^[70].

1.4. Forma crónica e aguda da doença

A hepatite C aguda é geralmente uma doença assintomática e aparentemente moderada, contudo a infeção viral persiste quase sempre, o que resulta no desenvolvimento de hepatite crónica [71]. A infeção por Hepatite C Crónica é geralmente associada ao desenvolvimento de cirrose, carcinoma hepatocelular, insuficiência hepática, e morte, especialmente em pacientes VIH positivos durante a terapia anti-retroviral ativa (Figura 1.3.) [12]. Por outro lado, também se verifica que dois terços das pessoas infetadas com VHC exibe manifestações extra-hepáticas [72].

O período de incubação da hepatite C é de 2 semanas a 6 meses. Após a infeção inicial, aproximadamente 80% das pessoas não exibem qualquer tipo de sintoma. Os que mostram sintomas acentuados podem apresentar febre, fadiga, diminuição do apetite, náuseas, vómitos, dores abdominais, urina escura, fezes cinzentas, dores nas articulações e icterícia [73].

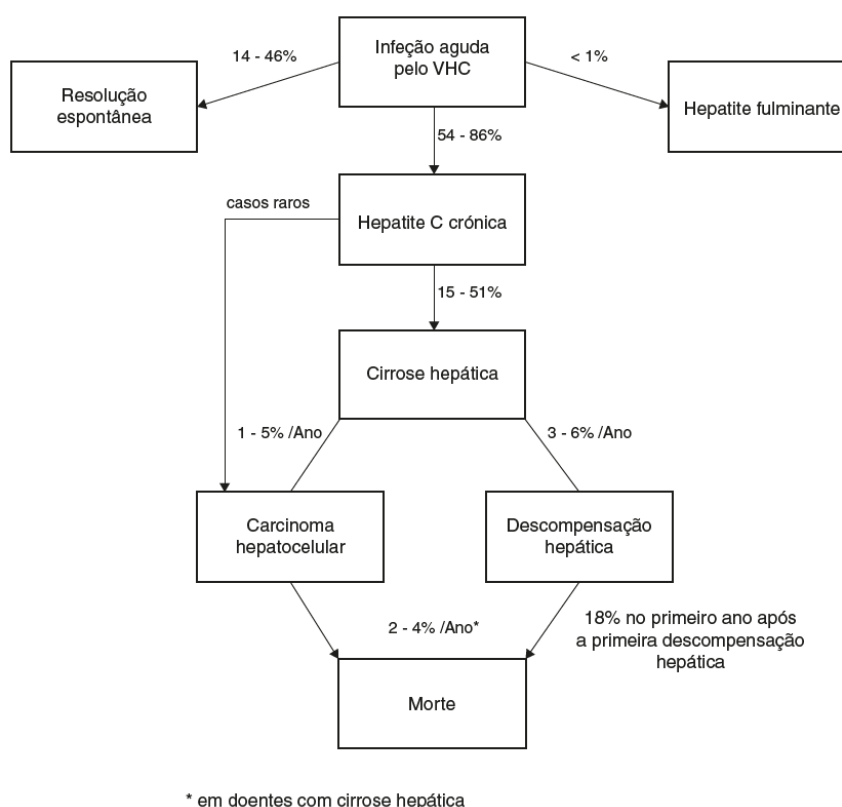


Figura 1.3. - História natural da infeção pelo VHC.

Fonte: Anjo J. et al. (2014) [12].

Calcula-se que ocorram anualmente cerca de 30 000 novos casos de infeção grave com o vírus da hepatite C.

Embora não haja critérios formais para o diagnóstico da infeção aguda por VHC, os seguintes são frequentemente utilizados na definição de grupos clínicos de estudo para tratamento da infeção aguda por VHC:

- um grande aumento dos níveis de ALT para 10 vezes mais o limite superior normal, com ou sem aumentos no nível total da bilirrubina;

- positividade para o RNA do VHC;
- uma exposição ao VHC durante 2-12 semanas anteriores ^[74].

A resolução espontânea ocorre em 15% a 25% dos indivíduos e pode chegar aos 45% em pessoas que apresentem icterícia, crianças e mulheres jovens. Taxas mais elevadas de resolução espontânea foram também observadas em pessoas com certos polimorfismos.

A HCC é definida como a persistência do RNA do VHC no sangue durante mais de 6 meses após o início da infecção aguda. Cerca de 55% a 85% dos pacientes com hepatite C aguda adquirem HCC. Quando a infecção se torna crônica a resolução espontânea é rara ^[75].

Tabela 1.5. - Fatores que afetam a história natural da hepatite C crônica.

Fatores do Hospedeiro	Fatores Virais	Fatores Ambientais
Genética	Carga Viral	Álcool
Gênero	Genótipo	Tabaco
Raça	Coinfecção com VHB	Uso de cannabis
Exercício	Coinfecção com VIH	Cafeína
Obesidade		
Esteatose		
Níveis de ALT		
Resistência à insulina		
Diabetes		
Idade de Infecção		

Adaptado de Lingala S. et al. (2015) ^[75]

A patogénese da lesão hepática induzida pelo VHC foi atribuída a um dano citopático direto ou a um dano imunomediado contra as proteínas codificadas pelo VHC ^[76]. Assim, diferentes fatores hospedeiros e virais foram reconhecidos como axioma para influenciar o desfecho clínico da doença (Tabela 1.5.).

1.4.1. Fatores de risco de evolução para cronicidade

Fatores do Hospedeiro:

· Genética

A compreensão e o sequenciamento do genoma humano permitiram a equipas de investigadores procurar associações entre variações genéticas e doença ^[77].

Estudos demonstram que uma forte resposta imune do hospedeiro contra o VHC favorece a eliminação do vírus. A variação nos genes envolvidos na resposta imune pode contribuir para a capacidade de eliminar o vírus. Em estudos de associação genética, o SNP (*single nucleotide polymorphism*) rs12979860 que está localizado no gene da IL28B (interleucina 28B), encontra-se associado a uma probabilidade maior de eliminar o vírus. No estudo de Thomas et al. verifica-se ainda

que indivíduos que apresentem o genótipo CC, têm uma suscetibilidade maior para eliminar o vírus que os que apresentam CT ou TT. Os de genótipo CC têm taxas de 53% já os TT têm 23% ^[78].

Género

Os homens apresentam um risco mais elevado para a progressão de doença hepática avançada ou cirrose e CHC.

Para além da diferença de géneros na prevalência de outros fatores de risco estabelecidos para a progressão da doença hepática, tais como o abuso de álcool e grande adiposidade visceral, as diferenças de sinalização de hormonas sexuais nos homens (androgénio) e nas mulheres (estrogénio) também têm sido sugeridas como um fator muito importante a ter em conta.

Algumas pesquisas experimentais de linhagem celular sustentam a importância do papel dos androgénios e estrogénios ou os seus recetores na progressão da doença relacionada com o VHC.

Por exemplo, o estradiol ou E2 (um poderoso antioxidante conhecido e o estrogénio mais presente antes da menopausa) mostrou inibir a produção do virão do VHC de uma maneira dependente do recetor de estrogénio ^[79].

Num artigo de Di Martino et al. foi relatado uma diminuição nos recetores de estrogénio, visível após a menopausa, como estando associado a um aumento da peroxidação lipídica e a uma diminuição da função da superóxido dismutase (SOD), levando a uma maior suscetibilidade para se desenvolver CHC. Sugerem assim que os estrogénios podem ter um efeito protetor em lesões histopatológicas a longo prazo em mulheres com hepatite C crónica. A situação de pós-menopausa é caracterizada por uma progressão acelerada da fibrose ^[80]. A gravidez não parece ter um impacto prejudicial na hepaticistologia e pode, de facto, ser protetora na progressão da fibrose e os contraceptivos orais parecem seguros em mulheres com hepatite C crónica.

Raça

Tem sido sugerido que em pacientes infetados com o vírus do genótipo 1b a doença progride mais rapidamente, embora esta questão seja controversa. É de notar que os afro americanos são mais frequentemente infetados com VHC, com uma prevalência próxima dos 4%. Aproximadamente 90% dos afro americanos infetados com VHC têm o vírus do genótipo 1a ou 1b ^[81].

Embora se acredite que o genótipo 1 do VHC está associado à progressão da doença, dados mais recentes sugerem que não tem efeito na gravidade da doença ou progressão para fibrose avançada.

O espectro de doenças hepáticas relacionadas com VHC entre afro americanos e caucasianos permanece controverso.

Num estudo levado a cabo por Sterling et al. advoga-se que os pacientes afro-americanos apresentam graus de necrose e fibrose parciais mais baixos, o que sugere que a taxa de progressão da fibrose em pacientes afro americanos pode ser mais lenta em comparação com pacientes caucasianos ^[82].

· **Exercício**

Os doentes com obesidade e doença hepática crónica, devem proceder a mudanças terapêuticas no seu estilo de vida. A gestão da obesidade não contribui apenas para a perda de peso, mas aumenta identicamente a sensibilidade à insulina, modifica o perfil lipídico sérico e contribui para uma melhoria da qualidade de vida ^[83].

McKenna et al. verificaram que estar acima do peso (41%) ou ser obeso (27%) está associado com o avanço da fibrose e consequentes riscos gerais para a saúde, incluindo o risco de diabetes tipo 2. E embora a perda de peso significativa não tenha sido demonstrada no presente estudo, estudos anteriores mostraram que o exercício pode facilitar a perda de peso e melhorar os índices metabólicos em pacientes com hepatite C ^[84].

O exercício é, portanto, uma terapia de baixo custo, fiável e sustentável para muitas doenças crónicas. O aumento da duração e a intensidade do exercício físico foi considerado como uma intervenção terapêutica importante no tratamento de doentes com doença hepática gorda não alcoólica (NAFLD- *Non-alcoholic fatty liver disease*) e doença hepática crónica. Assim, no estudo de El-Kader et al. o objetivo foi detetar alterações nas enzimas hepáticas e bem-estar psicológico como resposta à prática de exercícios aeróbicos em doentes com hepatite C crónica. Os resultados deste estudo indicaram que houve uma melhoria significativa nas enzimas hepáticas e bem-estar psicológico em doentes com HCC. O benefício do exercício nas doenças hepáticas é apoiado por outros estudos ou meta-análises que mostram o seu efeito benéfico nos níveis de ALT e esteatose ^[85].

· **Obesidade**

A obesidade, é um fator importante que acelera a progressão da fibrose. A presença da obesidade, definida por um IMC (Índice de Massa Corporal) maior ou igual a 30, parece acelerar a progressão da doença, deste modo medidas que tenham como objetivo a redução de peso podem desempenhar um papel importante no controlo da doença num determinado doente ^[86].

Fatores metabólicos do hospedeiro associados a um aumento do IMC podem ser responsáveis por alguma da variabilidade na taxa de progressão da fibrose em pacientes com hepatite C crónica ^[87].

· **Esteatose**

A acumulação anormal de gordura no fígado (esteatose) é frequentemente observada na infeção pelo VHC, e a gravidade da esteatose tem sido relacionada com o grau da fibrose hepática.

Em doentes com infeção crónica por VHC, a esteatose pode ocorrer em conjunto com outros fatores metabólicos de risco, como resistência à insulina e síndrome metabólica ^[88]. Ocorre também com frequência em indivíduos obesos e após ingestão excessiva de álcool ^[89].

Adinolfi et al. verificaram que os doentes com esteatose significativa, ou seja, superior a 30%, mostraram um maior grau de fibrose hepática comparativamente com os que tinham um grau menor ou sem esteatose ^[90]. Concluíram que na infeção crónica pelo VHC, a esteatose é um cofator importante na

aceleração do desenvolvimento da fibrose hepática e no aumento da atividade necroinflamatória, e que tanto fatores do hospedeiro como virais desempenham um papel na patogénese da esteatose em doentes com hepatite C crónica ^[90].

· **Níveis de ALT**

Sabe-se que a inflamação crónica está correlacionada com a homeostase metabólica e a ALT serve como um marcador substituto da lesão de hepatócitos ^[91].

Níveis anormais de enzimas hepáticas podem indicar dano hepático ou alteração no fluxo da biliar. Quando as células do fígado são danificadas, a ALT entra na corrente sanguínea e o nível de ALT no sangue é maior que o normal; uma elevação leve a moderada das enzimas em cinco vezes o limite superior do normal é observada em mais de 90% dos doentes ^[92].

· **Resistência à insulina/Diabetes**

Tanto a infeção pelo vírus da hepatite C e a diabetes são doenças comuns, com uma estimativa de 3,2 milhões de pessoas infetadas cronicamente com o VHC nos Estados Unidos e 25, 8 milhões que sofrem de diabetes ^[93].

A sugestão de que o VHC pode estar associado a diabetes mellitus tipo 2 (DM do tipo 2) foi feito pela primeira vez por Allison em 1994 ^[94].

As interações epidemiológicas e clínicas entre o VHC e a resistência à insulina (RI), uma das principais causas de diabetes tipo 2, são complexas e multidimensionais e têm consequências para a progressão do VHC, mas também na resposta à terapia e no desenvolvimento de complicações ^[95].

Há estudos que sugerem que uma expressão da proteína nuclear do VHC induz a resistência à insulina hepática através de alterações na sinalização na via do substrato -1 do recetor de insulina. Isso, juntamente com outros fatores, como dieta e obesidade, pode resultar na expressão do fenótipo diabético. Quando a resistência à insulina atinge valores que não são compensados pela célula β , a secreção de insulina diminui e aparece a hiperglicemia ^[94].

Outros estudos revelam igualmente que doentes com HCC e com RI são propensos a aumentos dos níveis séricos de leptina e TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), o que pode promover a ativação das células hepáticas estreladas (HSCs) e, consequentemente, aumentar a progressão da fibrose. Um outro estudo mostrou que a resistência à insulina pode influenciar as HSCs e elevar os níveis de fatores de crescimento do tecido conjuntivo, levando à produção excessiva de matriz extracelular (MEC) ^[96]. Existem, por outro lado, investigações que aludem ao facto do aumento da MEC provocar uma maior dificuldade nas ações da insulina ^[97].

· **Idade**

Num estudo de Minola et al. foram mencionadas diferenças estruturais, bioquímicas e/ou imunológicas nos fígados de crianças e adultos, principalmente no que diz respeito a mecanismos fibrogénicos; isto é, a reduzida disponibilidade de sistemas antioxidantes pode ser responsável pela

sensibilidade associada à idade do fígado aos compostos reativos do oxigénio e aos radicais orgânicos aldeídos formados durante a peroxidação lipídica, que pode causar a expressão de citocinas pro-inflamatórias e aumentar a síntese de colagénio pelas HSCs [98].

Fatores Virais:

· **Carga Viral**

Existem poucos estudos que defendam a relação entre a carga viral do VHC e o desenvolvimento da doença. A carga viral observada em pessoas com HCC geralmente varia de 10^4 a 10^8 cópias/mL, com uma média dos níveis de RNA do VHC de aproximadamente 10^6 cópias/mL [75].

A carga viral é mais um valor preditivo da resposta ao tratamento por parte de cada indivíduo.

· **Genótipo**

A progressão da fibrose hepática na hepatite C crónica tem sido considerada independente dos genótipos virais. No entanto, existem estudos que sugerem uma associação entre o genótipo 3 do vírus da hepatite C e a progressão rápida da doença hepática [99].

O estudo de Bochud et al., demonstra uma associação entre o genótipo 3 do vírus da hepatite C e a rápida progressão da fibrose hepática em doentes infetados cronicamente, e o potencial significado clínico dos genótipos do VHC, originalmente identificados como preditores do resultado da terapia com interferão [100].

· **Coinfecção com VHB**

Os doentes com infeção dupla por VHB/VHC têm um risco maior de progressão para a cirrose e doença hepática descompensada e têm um risco aumentado de CHC [101].

Os diferentes mecanismos que foram hipoteticamente associados ao desenvolvimento de CHC, relacionados ao VHB ou ao VHC sugerem que ambos os vírus podem ter um papel ativo em diferentes etapas do processo carcinogénico quando estão presentes juntos nos hepatócitos. A maioria das evidências sugere que o VHB é capaz de iniciar o processo neoplásico, enquanto que o VHC pode atuar como um promotor, e serem sinérgicos em causar CHC [101].

· **Coinfecção com VIH**

Diversos estudos demonstraram a ação nociva da imunodeficiência do VIH na história natural da hepatite C crónica. A taxa de progressão da fibrose hepática em pacientes co-infetados pelo VHC-VIH é cerca de 1,5 a 2 vezes mais rápida do que em pacientes infetados apenas pelo VHC [102].

Fatores ambientais:

· Álcool

O consumo excessivo de álcool pode piorar a evolução e o resultado da hepatite C crônica. Um grande número de estudos mostrou que altos níveis de ingestão de álcool aceleram a progressão da fibrose em pacientes com HCC. Tanto o VHC como o álcool são estímulos conhecidos do stresse oxidativo hepático e da peroxidação lipídica, sugerindo que a coexistência desses fatores pode potencializar essas vias, levando ao aumento da ativação de células fibrogênicas do fígado e subsequente aceleração da fibrogênese ^[103].

· Tabaco

Os resultados de estudos sobre o tabaco como um fator de risco para a HCC têm sido contraditórios, variando de nenhum risco significativo a um aumento de três vezes em comparação com os não fumadores ^[104].

A progressão da fibrose pelo tabagismo é indefinida. A nicotina, um dos principais componentes do fumo do tabaco, é rapidamente absorvida pelos pulmões, lançada na circulação e principalmente metabolizada no fígado ^[105]. É biologicamente plausível, o efeito nefasto do tabaco devido ao potencial carcinogênico de vários dos seus componentes ^[104].

As lesões hepáticas provocadas pelo tabaco têm sido atribuídas, in vitro e in vivo, ao stress oxidativo associado à peroxidação lipídica. Em doentes com HCC, a redução nas concentrações de glutathiona hepática, plasmática e linfocítica poderia favorecer o efeito hepatotóxico do tabagismo. Até ao momento, a toxicidade da nicotina no fígado só foi estudada em animais, não permitindo a extrapolação para os humanos ^[105].

· Uso de cannabis

A *Cannabis sativa* droga recreativa bastante usada, contém mais de 60 compostos ativos, sendo o mais ativo o Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC). Os canabinóides ligam-se aos recetores 2 acoplados à proteína G, CB1 e CB2, que se ligam igualmente ao THC ^[106].

Os recetores CB1 estão predominantemente no cérebro e são responsáveis pelos efeitos psicoativos do THC, enquanto os recetores CB2 são principalmente expressos em células do sistema imunológico. A expressão de ambos os recetores também foi demonstrada numa variedade de tecidos periféricos. No estudo de Hézode et al. descobriu-se que a expressão dos recetores CB1 e CB2 sofrem produção acentuada no fígado humano com cirrose. Também se demonstrou que os recetores CB1 aumentam muito a fibrogênese hepática experimental, enquanto os recetores CB2 exercem efeitos antifibrogénicos opostos ^[107].

Van der Poorten et al. constaram que o recetor CB1 manifesta-se em todos os doentes com HCC, com uma significativa regulação positiva em comparação com os pacientes controlo. Enquanto a expressão CB1 foi maior naqueles com fibrose avançada, os níveis em doentes com hepatite C precoce

(fibrose 0-1 e sem esteatose) foram ainda quatro vezes maiores que os níveis dos que serviram como controles. Além disso, houve uma forte associação positiva entre a expressão de CB1 e a carga viral do VHC ^[108].

· **Cafeína**

Tem sido dada atenção a possíveis efeitos benéficos do consumo de café em doenças do fígado.

O estudo de Honjo et al. mostrou que o consumo de café está relacionado não só com menor prevalência de níveis elevados de AST (aspartato transaminase) /ALT (inflamação do fígado) mas também níveis mais baixos no soro de AST e ALT entre os que não apresentam inflamação do fígado ^[109].

No estudo de Ruhl et al., em relação ao consumo de café, mostraram-se efeitos benéficos no fígado por parte dos vários componentes do café, incluindo a cafeína, os óleos de café (*kahweol and cafestol*), e extratos aromáticos isolados de grãos de café. Verificou-se uma relação mais benéfica com o consumo de cafeína do que com o café propriamente dito ^[110].

1.5. Doença Hepática - Fibrose Hepática

A infecção crónica pelo vírus da hepatite C é tipicamente caracterizada por uma fibrose hepática lentamente progressiva, com progressão do estágio 0 (sem fibrose) até o estágio 4 (cirrose) ocorrendo em aproximadamente 0,10-0,15 unidades de fibrose (mediana) por década ^[111]. A fibrose é uma resposta inespecífica e muitas vezes desproporcional a uma lesão tecidual ^[112].

Existem vários co-factores associados a uma progressão acelerada da fibrose hepática entre os quais se destacam o sexo masculino, idade mais avançada na aquisição da infecção pelo VHC, obesidade, co-infecção com VIH, co-infecção com vírus da hepatite B e consumo de álcool ^[113].

A fisiopatologia da fibrose envolve lesão hepática crónica e implica a interação de vários tipos de células hepáticas; requer lesão de hepatócitos e morte celular, ativação de células de Kupffer (CK), ativação de células hepáticas estreladas e inflamação crónica (Figura 1.4.) ^[114].

As células hepáticas estreladas, ativadas por citocinas fibrogénicas (e.g. TGF- β 1 (*Transforming growth factor beta* 1) e TNF- α), foram identificadas como as principais células produtoras de colagénio no fígado lesado ^[114].

A fibrose hepática é, portanto, uma acumulação excessiva de proteínas da matriz extracelular no parênquima hepático, tais como colagénio, laminina, elastina e fibronectina ^[115,116].

A lesão provocada no fígado faz com que células estreladas hepáticas se tornem mais ativas, o que desencadeia um aumento da síntese da matriz extracelular ^[116]. Não só aumentam as quantidades normais de depósitos de fibras de colagénio (predominantemente colagénio I e III) nos espaços extracelulares das células do fígado, como também leva estas células a perderem sangue, tornando-as rígidas ^[116,117].

Primeiro, as HSCs, tornam-se diretamente fibrogénicas, aumentando a síntese e a deposição de MEC. Em segundo lugar, as células fibrogénicas proliferam, o que aumenta drasticamente o número destas células no fígado ^[118].

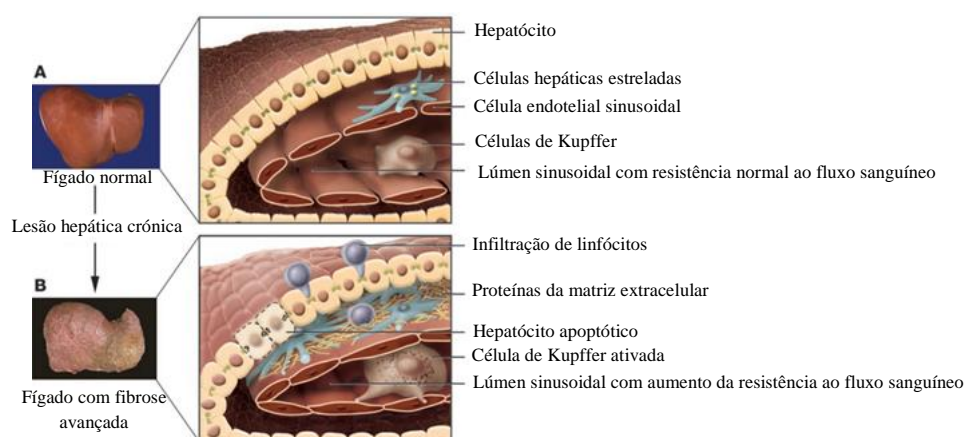


Figura 1.4. - Alterações na arquitetura hepática (A) associada a fibrose hepática avançada (B). Adaptado de Bataller R. et al. (2005) ^[119]

À medida que a doença hepática fibrótica evolui, ocorre a progressão desta para as bandas de colagénio, para a fibrose em ponte e a cirrose franca ^[119]. Isso leva a um agravamento da função hepática, exemplificado pela capacidade comprometida de eliminar toxinas e sintetizar proteínas chave, lípidos e hidratos de carbono que são necessários à manutenção das funções corporais ^[120]. Isto tem como consequência disfunção hepática, hipertensão portal e aumento de risco para cancro hepático ^[121].

1.6. Metabolismo intermediário e alterações na função hepática

1.6.1. Transaminases e fosfatase alcalina

Estes marcadores são úteis para diagnosticar, calcular a gravidade, monitorar a terapia e igualmente avaliar o prognóstico de doenças hepáticas. De realçar a medição da atividade de enzimas, ou seja, transaminases (AST e ALT) e da fosfatase alcalina (FA).

A alanina transaminase sérica é libertada do tecido hepático para a circulação de acordo com o grau de lesão hepatocelular, e o seu nível é considerado um dos marcadores mais sensíveis de lesão hepática e progressão da doença hepática. Os níveis séricos de aspartato transaminase são preditores bem mais importantes da atividade histológica do que os níveis séricos de ALT. A relação entre AST/ALT é sugerida como um teste de cirrose. A relação entre AST e ALT tende a aumentar com o avanço dos graus de fibrose de aproximadamente 0,8 em indivíduos saudáveis. A maior vantagem dessa relação é que ela é adequada para o diagnóstico não invasivo de cirrose, em que uma proporção de mais de 1 sugere a presença de cirrose ^[122].

A fosfatase alcalina, catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato em pH alcalino. O aumento dos níveis séricos da fosfatase alcalina estão relacionados com alterações hepáticas no fígado. A resposta do fígado a qualquer forma de obstrução da árvore biliar é a síntese de FA a partir da membrana canalicular dos hepatócitos, o que leva à elevação dos níveis de fosfatase alcalina ^[123]. Nas hepatites infecciosas, nas doenças hepáticas assiste-se, geralmente, apenas a um aumento moderado da atividade sérica de fosfatase alcalina ^[123].

1.6.2. Metabolismo do ferro

O ferro é um nutriente essencial para os seres humanos, pois tem funções importantes em muitos processos celulares ^[124]. É crucial ao transporte de oxigénio, à síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e ao metabolismo energético. É um cofator importante para as enzimas da cadeia respiratória mitocondrial bem como na fixação de azoto ^[125]. A homeostasia do ferro no organismo é regulada por forma a garantir uma porção de ferro suficiente às inúmeras funções essenciais em que está envolvido e evitando igualmente o seu excesso ou a sua falta ^[126]. A regulação das concentrações plasmáticas de ferro é feita pela hepcidina, uma hormona peptídica com 25 aminoácidos (Figura 1.5.), a qual apresenta também um papel fundamental na inflamação e resposta imune à infeção ^[127].

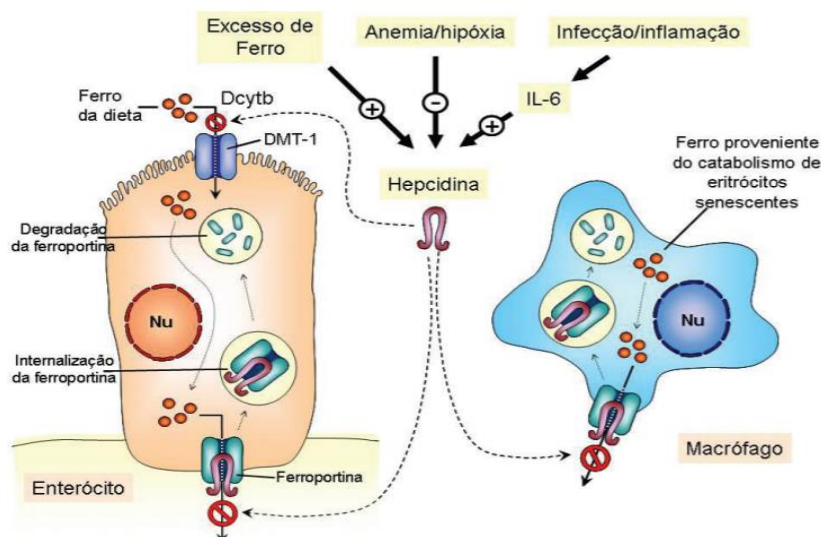


Figure 1.5. – Ação da hepcidina no metabolismo do ferro.

Legenda: Dcytb, ferroredutase; DMT-1, transportador de metal divalente-1; IL-6, interleucina 6; Nu, núcleo.

Fonte: Grotto H. (2008) ^[125]

O fígado é um dos principais órgãos envolvidos no metabolismo do ferro e apresenta recetores para o excesso de ferro. Concentrações hepáticas elevadas desse metal podem resultar em lesão hepatocelular, fibrose e cirrose ^[128].

20 a 35% dos pacientes com hepatite C crónica apresentam níveis aumentados de valores séricos de ferro (saturação de transferrina, ferro sérico e ferritina sérica) ^[129].

Na hepatite viral crónica, acredita-se que o ferro se acumule principalmente devido a um processo de lesão no qual os hepatócitos infectados libertam hemosiderina que é absorvida pelas CK. Contudo, podem estar também implicados outros mecanismos, como regeneração de hepatócitos, libertação de citocinas, alterações na captação de ferro devido à necroinflamação crónica e desvio intra-hepático ^[130].

Evidências indiretas baseadas em medidas séricas dos depósitos de ferro preconizam que o excesso de ferro pode agravar a atividade necroinflamatória hepática na hepatite viral crónica e que a fibrose pode estar aumentada pela sobrecarga de ferro ^[131].

Num estudo em ratos-do-deserto o ferro mostrou causar fibrose após injeção subcutânea. Após 6 semanas, as células hepáticas estreladas mostraram um aumento acentuado no RNA mensageiro para a síntese de colagénio e cirrose micronodular desenvolvida após 4 meses com expressão aumentada do TGF- β 1 ^[132].

1.6.3. Metabolismo lipídico

Estudos têm demonstrado uma interação entre a HCC e o metabolismo lipídico e a presença de esteatose hepática e alterações lipídicas relevantes ^[133].

Existe uma diminuição nos níveis séricos de colesterol total, LDL e apolipoproteína B (APOB), o principal constituinte proteico de LDL e VLDL ^[134]. Estes níveis mais baixos podem estar relacionados com níveis de fibrose hepática mais avançada.

Para além disso, os lípidos desempenham um papel crucial no ciclo de vida do vírus da hepatite C. A montagem e a maturação do VHC nos hepatócitos dependem da proteína de transferência de triglicéridos microssomais e da APOB de uma forma paralela à formação de VLDL ^[134].

1.6.4. Metabolismo da glicose

O fígado é também responsável pela manutenção do metabolismo da glicose, armazenando glicose e produzindo glicose endógena a partir dos depósitos de glicogénio no fígado ou da atividade neoglicogénica (transaminases); estas atividades contribuem para preservar os níveis normais de glicose no sangue ^[135].

Na presença de lesão hepática, menos insulina é absorvida pelo hepatócito e degradada, causando uma situação de hiperinsulinemia crónica. A cirrose hepática pode ser acompanhada de resistência à insulina causando uma ineficácia do fígado na metabolização da glicose em excesso. Como resultado, os níveis de glicose no sangue aumentam.

Estudos demonstraram uma associação entre a diabetes mellitus tipo 2 e o aumento da progressão da fibrose em doentes com infeção crónica pelo VHC ^[136].

1.7. Doença Hepática - Fibrose Hepática

O carcinoma hepatocelular é a doença hepática primária mais comum e é uma das principais causas de morte associadas com cancro em todo o mundo ^[137]. O CHC é um tumor maligno decorrente de hepatócitos, as células do parênquima do fígado ^[138].

A doença hepática crónica e a cirrose continuam a ser os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do CHC, dos quais a hepatite viral e o consumo excessivo de álcool são as principais causas de risco no mundo ^[137].

O padrão de ocorrência de CHC mostra um desequilíbrio geográfico significativo, com as maiores taxas de incidência na Ásia Oriental (mais de 50% dos casos ocorrem na China) e na África subsariana, juntas representam cerca de 85% de todos os casos. Na Europa, a incidência é menor, com exceção do Sul da Europa, onde a incidência em homens é significativamente maior (Figura. 1.6.) ^[139].

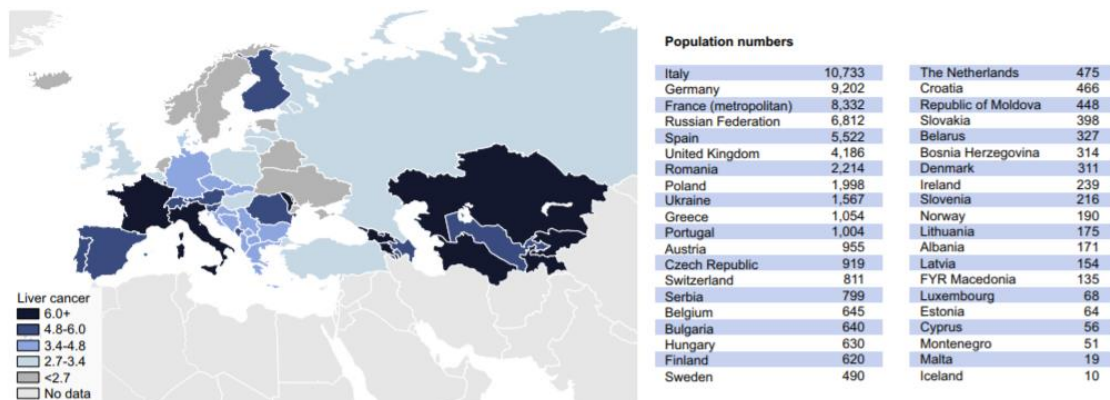


Figura 1.6. - Taxas de incidência de cancro do fígado de acordo com a distribuição geográfica na Europa.

Fonte: Galle P. R. et al. (2018) ^[139]

Doentes com fibrose avançada ou cirrose têm um risco elevado de carcinogénese porque as alterações cromossómicas que ocorrem nos tecidos fibróticos estão associadas a formação tumoral.

Nos hepatócitos cirróticos, a redução dos telómeros pode levar à falta de proteção dos cromossomas, o que provoca lesões no DNA e fusão cromossómica. As células com cromossomas fundidos que entram no ciclo celular podem desenvolver translocações e instabilidade cromossómica que pode levar à carcinogénese ^[140].

A carcinogénese relacionada com VHC resulta de uma combinação complexa de fatores do hospedeiro, ambientais e virais. Supõe-se que a indução da hepatocarcinogénese seja desencadeada principalmente pelo efeito indireto da inflamação crónica imuno-mediada. No entanto, o VHC também pode provocar diretamente o CHC alterando várias vias reguladoras do hospedeiro envolvidas na proliferação, metabolismo energético, angiogénese, transição epitelial mesenquimatosa, reparação de DNA, apoptose e stress oxidativo ^[141].

1.8. Sistema de Fase Aguda Renina-Angiotensina

Evidências crescentes indicam que os fatores genéticos influenciam a história natural das doenças crônicas do fígado. Tem havido um interesse especial na fibrose hepática ^[142].

Há provas que indicam que o sistema de fase aguda renina-angiotensina (SRA) tem um papel importante na progressão da fibrose no fígado ^[143].

Este sistema gera hormonas, que têm um papel importante na homeostase dos fluídos corporais e na função do sistema cardiovascular. O angiotensinogénio (AGT), uma proteína de fase aguda do grupo dos inibidores das serinas proteases, é secretado pelo fígado. Este é clivado pela enzima plasmática circulante, a renina, para gerar angiotensina I (Ang. I), que por sua vez é clivada no octapéptido, angiotensina II (Ang. II), pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (Figura 1.7.) ^[144].

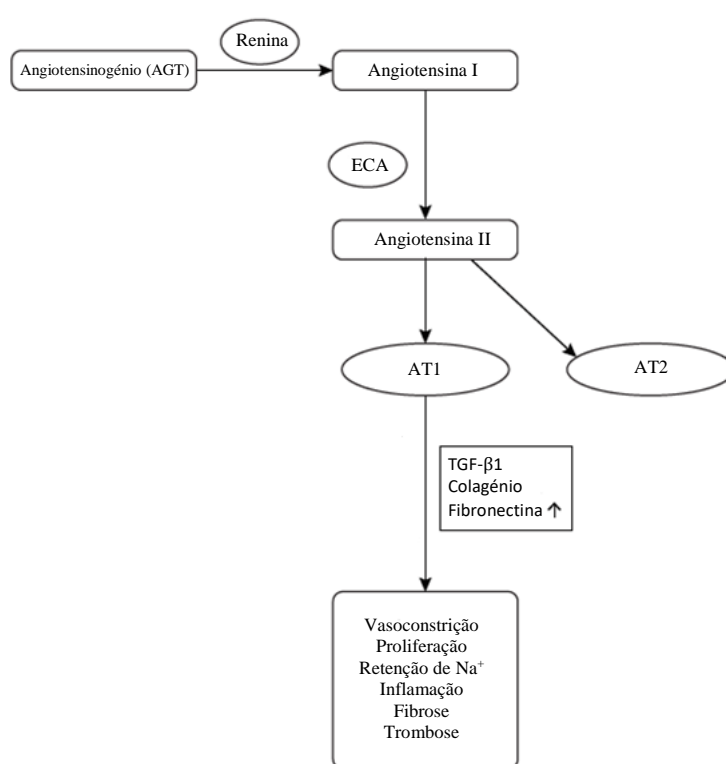


Figura 1.7. – Esquema do sistema renina angiotensina.
Adaptado de Shim et al. (2018) ^[145]

A Ang. II, componente ativa do SRA está implicada na fisiopatologia das doenças cardiovasculares através de dois subtipos distintos de recetores de superfície celular: recetor da angiotensina II tipo 1 (AT1) e recetor da angiotensina II tipo 2 (AT2) ^[144]. O AT1 medeia os efeitos provocados pela Ang. II, nomeadamente a regulação da pressão sanguínea, bem como a homeostase de sódio e água ^[146]. Localmente, a ativação de AT1 estimula os efeitos profibróticos, nomeadamente o recrutamento de células inflamatórias, angiogénese, proliferação celular e acumulação de MEC (Figura 1.8.) ^[146].

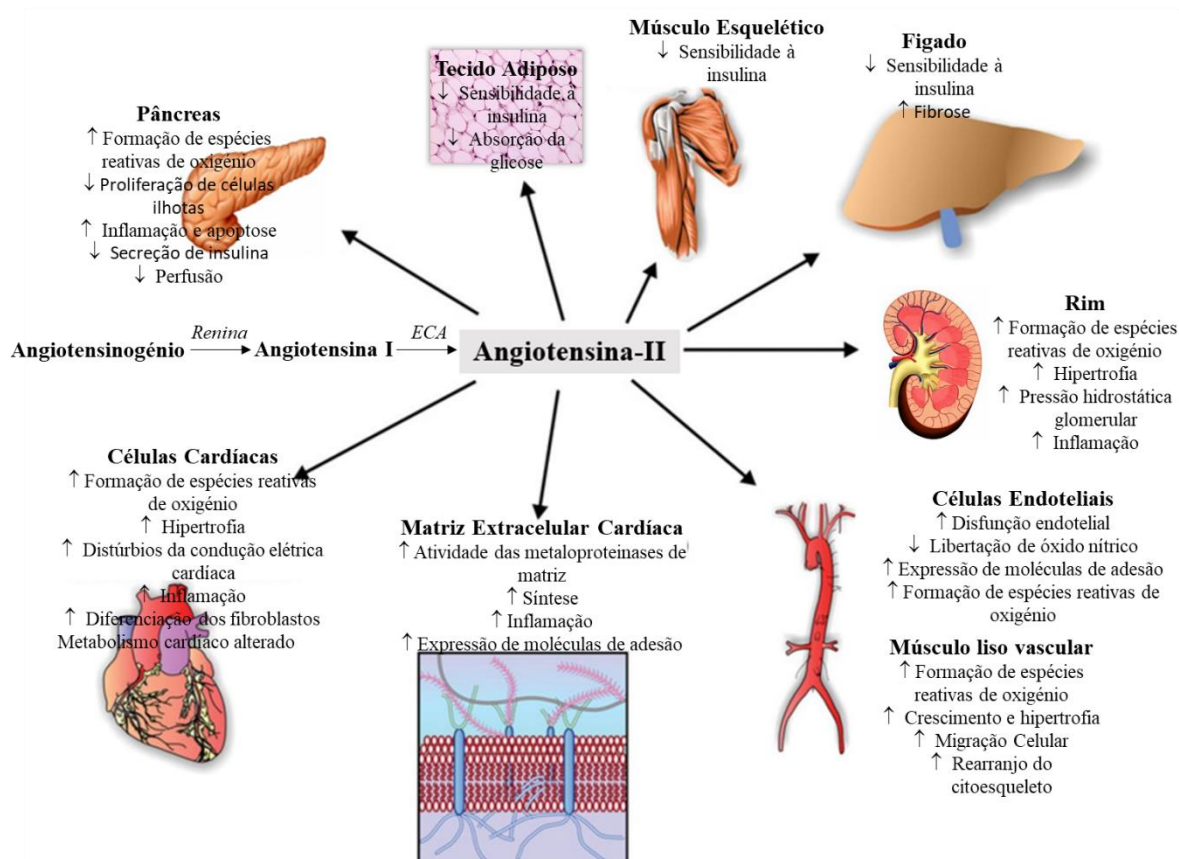


Figura 1.8. – Representação esquemática das várias ações da angiotensina II em diversos órgãos. Adaptado de Patel et al. (2014) ^[147]

Alguns estudos centram-se no sistema renina-angiotensina como um mecanismo de fibrose hepática, em que se comprova que a angiotensina II, o produto deste sistema, aumenta diretamente o TGF- β 1 e as células hepáticas estreladas ^[148]. Ou seja, a Ang. II está envolvida no recrutamento de células inflamatórias em resposta a uma lesão hepática e na transformação das células hepáticas estreladas no seu fenótipo ativo. Além disso, a Ang. II estimula a produção de TGF- β , que aumenta a produção de matriz extracelular e regula positivamente moléculas de adesão de matriz ^[148]. A Ang. II também é um poderoso quimio-atrativo para HSCs ativadas, concentrando essas células no local da lesão hepática. Esses efeitos podem ser amplificados pela regulação positiva de componentes principais do SRA local por lesão hepática, criando um ciclo autócrino no qual a lesão aumenta a produção de angiotensina II e, neste caso, perpetua a lesão hepática e a fibrose ^[149].

Ambos os genes da ECA e do recetor AT1 são regulados positivamente em áreas de fibrogénese hepática ativa, e a ativação do AT1 pela Ang. II induz a contração e proliferação de HSCs ^[149]. Como potenciais terapias antifibróticas faz sentido o uso de bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRA) ou inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) que levem à redução da inflamação e a uma melhoria na fibrose hepática ^[149].

Recentemente foram descobertos novos componentes do sistema SRA, como a enzima conversora de angiotensina II (ECA II) que é uma metaloproteinase de zinco capaz de clivar um único aminoácido do terminal carboxi da Ang. II para gerar Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)), que ao contrário

da Ang. II apresenta propriedades anti-inflamatórias, anti-fibróticas e anti-trombóticas ^[144]. A Ang-(1-7) actua principalmente através de um recetor acoplado à proteína G. Estas novas descobertas permitem perceber que tanto a estimulação do recetor AT2 como a geração de Ang-(1-7) servem como contrapeso na regulação do efeito do recetor AT1 ^[144].

Pode perceber-se que os efeitos de Ang. II se estendem para além das ações sistémicas cardiovasculares e renais. É agora evidente que existe um SRA local em quase todos os órgãos e tecidos, incluindo o coração, vasos sanguíneos, cérebro, rim, gordura, fígado e pele, ou seja, não é apenas uma hormona que é libertada para a circulação ^[146].

É importante entender como determinados polimorfismos genéticos de genes do SRA se relacionam com a doença hepática. Os polimorfismos genéticos correspondem a variações naturais de um gene, sequência de DNA, proteína ou cromossoma que não traduzem defeitos adversos maiores para o indivíduo e que ocorrem geralmente numa frequência superior a 1% na população geral. Tendo em conta este facto, diversos polimorfismos genéticos como os referentes aos genes do angiotensinogénio (T174M e AT-6 G/A), da enzima conversora da angiotensina (ECA – polimorfismo de inserção/deleção) e do recetor 1 da angiotensina II (A1166C), têm sido investigados.

1.8.1. Gene do Angiotensinogénio (AGT) - T174M e AT-6/GA

O AGT é produzido pelo fígado e transformado em Ang. I via renina. Posteriormente, a Ang. I é convertida em Ang. II, o que leva a hipertrofia miocárdica, fibrose e vasoconstrição ^[150].

O gene do angiotensinogénio localiza-se no cromossoma 1q42-43 e consiste em 5 exões e 4 intrões que abrangem 13 kb (quilo pares de bases) ^[151].

Uma substituição de uma treonina para metionina no aminoácido 174 é um polimorfismo comum, chamado T174M, encontrado neste gene. Existem vários estudos que demonstraram que o polimorfismo AGT T174M está relacionado com a suscetibilidade a doenças coronárias e hipertensão ^[152]. Esta variante encontra-se assim relacionada a níveis elevados de AGT que levam a um aumento da pressão sanguínea ^[153].

Existe uma variante molecular no promotor proximal do gene do AGT, uma adenina no lugar da guanina seis nucleotídeos acima do local de iniciação da transcrição, A (-6) ^[154]. O alelo A foi associado *in vitro* com uma expressão aumentada do gene AGT e com maior síntese de AGT ^[155].

1.8.2. Gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) - I/D

A enzima conversora de angiotensina é uma dipeptidil carboxipeptidase presente principalmente na superfície do lúmen do endotélio pulmonar ^[156].

A ECA existe em duas formas: ECA testicular e ECA somática, as quais representam funções fisiológicas distintas. A ECA testicular exerce um papel crucial em termos da reprodução; já a ECA somática, que é composta por dois domínios catalíticos (N- e C-), é responsável pela regulação da pressão arterial e pela homeostase dos eletrólitos ^[157].

Estes dois domínios cataliticamente ativos, embora muito semelhantes na sequência e na topologia estrutural, exibem diferenças nas capacidades de processamento do substrato ^[158].

A ECA é capaz de hidrolisar a hormona polipeptídica bradicinina e, portanto, aumentar a resposta da pressão arterial ^[158].

Além disso é capaz de clivar uma variedade de péptidos que estão fora do seu campo de ação relacionados com a pressão arterial. De entre estes substratos estão o *N*-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina (Ac-SDKP), que é um regulador negativo da hematopoiese, a substância P, a hormona luteinizante, angiotensina 1-7 e a neurotensina ^[159,160].

Destaca-se a importância da Ac-SDKP, libertada pela timosina β 4 pela ação da propil oligopeptidase e metabolizada no domínio N- ^[161]. Inicialmente é descrita como supressora da proliferação de células da medula óssea através da inibição da transição da fase G1-S do ciclo celular ^[158]. Descobertas posteriores indicam que também possui potentes efeitos anti-fibróticos e anti-inflamatórios em numerosos tecidos, incluindo o coração, fígado, rim e pulmão. É capaz de atenuar os efeitos do TGF- β , um marcador relevante de fibrose ^[158].

O gene ECA humano está localizado no cromossoma 17q23 e contém um polimorfismo baseado na presença (inserção -I) ou ausência (deleção -D) de um domínio de DNA com 287 pares de bases (pb) dentro de um intrão, resultando em três genótipos (Homozigótico - DD e II e heterozigótico - ID) ^[162].

Há variantes genéticas desta enzima que, em particular o genótipo DD, podem aumentar o risco da existência de tumores. Em estudos recentes, em que se determinaram os níveis plasmáticos de ECA, verificou-se que estes foram mais elevados em indivíduos com o genótipo ECA-DD, mais baixos com o genótipo II e intermédios em heterozigóticos ID ^[162]. Isto sugere que o polimorfismo DD está associado ao aumento da expressão de ECA e níveis de circulação mais elevados de Ang. II.

Existem estudos que argumentam que os níveis séricos de ECA estão aumentados em pacientes com doença hepática crónica e outros que a atividade da ECA é um indicador efetivo da gravidade da doença hepática. Já outros estudos propõem que qualquer aumento na atividade da ECA no VHC crónica não está relacionado com genótipo da mesma ^[112].

1.8.3. Gene do recetor tipo I da Angiotensina II (AGTR1) - A1166C

Bonnardeaux et al., em 1994, descreveram uma substituição de nucleotídeos (A/C na posição 1166) no gene do AT1 ^[163].

O gene do AT1 humano tem um comprimento que excede os 55 kb, é composto por cinco exões e quatro intrões, e é altamente polimórfico ^[164].

Foi descrito um SNP em que existe ou uma base de adenina (A) ou de citosina (C) (transversão de A/C) na posição 1166 na região 3'UTR do gene ^[164]. O alelo A não possui sítio de restrição enzimática é designado como o fragmento maior, ao passo que o alelo C, que possui um sítio de restrição enzimática na posição nucleotídica 1166, é designado como o fragmento menor ^[164]. Uma sensibilidade elevada à Ang. II foi detectada em indivíduos portadores do alelo 1166C ^[165].

Verificou-se maior prevalência do alelo C em hipertensos. O polimorfismo A/C 1166 foi associado à rigidez da aorta, massa ventricular esquerda e vasoconstrição coronária, para além disso foi considerado como um fator de risco para o enfarte do miocárdio em sinergismo com o polimorfismo de deleção de gene ECA. Estas associações podem dever-se a uma alteração do gene AT1 ou ao efeito de um locus do gene ainda não identificado em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo AT1 [163].

Tabela 1.6. – Quadro resumo dos polimorfismos estudados: via primária, alelo, alteração nucleotídica ou proteica, possível efeito da variação alélica, direção esperada do efeito no risco.

Gene	Via primária	Alelo	Alteração nucleotídica ou proteica	Possível efeito da variação alélica	Direção esperada do efeito no risco (maior grau de fibrose)
ECA	Converte a angiotensina I em angiotensina II	D	I/D; Inserção (I), de uma sequência Alu de 287 pb no intrão 16	Maior atividade do Enzima Conversor da Angiotensina	Aumenta
AGTR1	Codifica o receptor tipo 1 que medeia os principais efeitos cardiovasculares da angiotensina II	C	A1166C; Alteração de uma adenina (A) por uma citosina (C) na posição 1166 da região 3'UTR	Sensibilidade aumentada à Angiotensina II	Aumenta
AGT	Codifica o angiotensinogénio	T(M)	T207M; Alteração de uma citosina (C) por uma timina (T) no exão 2; Troca funcional de treonina (T) para metionina (M) no codão 207	Níveis diminuídos de Angiotensinogénio	Diminui
		A	AT-6G/A; Substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição -6 (promotor).	Expressão aumentada do gene AGT; maior síntese de Angiotensinogénio	Aumenta

2. Objetivos

O presente estudo tem como objetivo geral determinar se polimorfismos genéticos de genes que codificam proteínas do sistema Renina-Angiotensina, especificamente a ECA, o AGT e o AT1, influenciam a suscetibilidade para a Hepatite C Crónica e a progressão da doença hepática (fibrose hepática).

Como objetivos secundários, pretende-se:

- Estudar a relação de parâmetros bioquímicos, em particular da atividade da ECA, com a infeção crónica pelo VHC e o grau de fibrose hepática;
- Relacionar esses parâmetros com os polimorfismos genéticos estudados;

3. Materiais e Métodos

3.1. Caraterização da População em Estudo

A amostra populacional engloba 131 doentes com Hepatite C Crónica seguidos na consulta de Hepatologia do Hospital Santa Maria (HSM (Hospital de Santa Maria) / CHLN (Centro Hospitalar Lisboa Norte)). Apresentavam uma média de idades de 54,22 e de IMC de 25,79. Tinham uma distribuição por sexo de 53,6% de homens e 43,4% de mulheres.

Para a realização do estudo, os indivíduos que constituíram a amostra, tiveram de obedecer a alguns critérios de inclusão e exclusão (Tabela 3.1.).

Tabela 3.1. - Critérios de inclusão e exclusão.

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Doentes com Hepatite C Crónica	Presença de outras doenças crónicas do fígado (hepatite viral (A e B), doenças auto-imunes e outras doenças genéticas e/ou metabólicas)
Idade superior ou igual a 18 anos	Infeção concomitante do HIV
Ambos os sexos	Consumo de álcool superior a 40g/dia
Consentimento informado	Mulheres grávidas
	Indivíduos com capacidades comprometida

Estes doentes foram também submetidos a uma avaliação clínica com recolha de parâmetros antropométricos e sociodemográficos. Foi feita a colheita de sangue periférico para análises bioquímicas padrão e para o estudo genético, mediante consentimento informado.

No estudo foi igualmente incluído um grupo de controlo com 144 indivíduos, que não apresentava a doença (Hepatite C Crónica), seguido na consulta de endocrinologia da Clínica de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo de Lisboa Lda. Foram analogamente submetidos a uma avaliação clínica com recolha de parâmetros antropométricos e sociodemográficos.

Parâmetros Recolhidos

Parâmetros antropométricos

- Peso (P) - Kg
- Altura (A) – m
- Índice de Massa Corporal (IMC) – Kg/m^2

O Índice de Massa Corporal (IMC) fornece uma medida de obesidade útil a nível populacional. O (IMC) é uma razão entre o peso e a altura.

$$IMC = \frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Altura (m)}^2}$$

Parâmetros sociodemográficos

- Género (masculino e feminino)
- Idade

Parâmetros bioquímicos

- Carga viral (VHC-RNA) - UI/mL
- Plaquetas - U
- Fosfatase alcalina - UI/mL
- Aspartato transaminase (AST) - UL/mL
- Alanina transaminase (ALT) - UL/mL
- Gama-glutamyl-transpeptidase (GGT) - UL/mL
- Glicémia - mg/dL
- Insulina - mU/mL
- HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*) -

O HOMA é um método utilizado para quantificar a resistência á insulina. Pode calcular-se através da fórmula seguinte.

$$HOMA = \frac{Glicémia \left(\frac{mg}{dL} \right) \times Insulina \left(\frac{mU}{mL} \right)}{405}$$

- Péptido C - ng/mL
- Colesterol Total - mmol/L
- Lipoproteína de alta densidade (HDL) - mmol/L
- Lipoproteína de baixa densidade (LDL) - mmol/L
- Triglicéridos - mmol/L
- Apolipoproteína A1 (APOA1) - g/mL
- Ferro Sérico - mg/dL
- Saturação da transferrina - %

A saturação é utilizada na avaliação do metabolismo do ferro. Corresponde à razão entre o ferro sérico e a transferrina.

$$Saturação da transferrina (\%) = \frac{Ferro\ sérico \left(\frac{mg}{dL} \right)}{Transferrina \left(\frac{mg}{dL} \right)} \times 100$$

- Transferrina - mg/dL
- Ferritina - ng/mL
- Haptoglobina - mg/dL
- Ceruloplasmina - mg/Dl

Avaliação do Grau de Fibrose

O grau de fibrose foi avaliado por elastografia hepática transitória (*FibroScan* ©) (Echosens, Paris, France) nos doentes com HCC, na Unidade de Técnicas de Gastrenterologia do Hospital Santa Maria (HSM/CHLN). Utilizou-se um transdutor de ultra-som de 5 MHz montado no eixo de um vibrador. O vibrador gera uma vibração indolor (frequência de 50 Hz e amplitude de 2 mm) semelhante a um “movimento rápido”, gerando uma onda de cisalhamento que se propaga através da pele e do tecido subcutâneo até ao fígado. A velocidade da onda está diretamente relacionada ao LS. O valor mediano de 10 aquisições bem sucedidas foi expresso em kilopascal (kPa), com uma taxa de sucesso de pelo menos 60% e com um intervalo interquartil (IQR) inferior a 30% ^[166]. Valores de corte validados no Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal (análise de 110 pacientes, classificação Scheuer): 5,43kPa para $F \geq 2$ (PPV 0,78; VPL 0,67); 8,18 kPa para $F \geq 3$ (PPV 0,95 NPV 0,93); 10,08kPa para $F = 4$ (PPV 0,93; NPV 0,93) ^[167].

As tabelas 3.2. e 3.3. resumem as características antropométricas, sociodemográficas, bioquímicas e histológicas da população em estudo.

Tabela 3.2. - Características antropométricas, sociodemográficas e bioquímicas (variáveis contínuas)

	Variáveis	Unidades de Medida	N	Média	Desvio Padrão
Parâmetro sociodemográfico	Idade	Anos	114	54,22	11,86
Parâmetro antropométrico	IMC	Kg/m ²	105	25,79	7,75
Carga Viral	RNA	UI/mL	114	2,24E+06	3,84E+06
	Plaquetas	U/mm ³	114	2,02E+05	7,56E+04
Marcadores Hepáticos	Fosfatase Alcalina	UI/mL	114	79,85	34,33
	AST	UL/mL	115	56,35	31,57
	ALT	UL/mL	115	73,08	50,28
	GAMA GT	UL/mL	115	82,55	87,66
Metabolismo Lipídico	Colesterol total	mmol/L	113	4,37	0,92
	HDL	mmol/L	111	1,58	0,62
	LDL	mmol/L	108	2,43	0,81
	Triglicéridos	mmol/L	114	1,16	0,60
	APOA1	g/L	108	4,25	19,77
Metabolismo do Ferro	Ferro	mg/dL	112	126,56	47,01
	Ferritina	ng/mL	112	255,09	200,83
	Saturação	%	115	38,61	15,27
	Transferrina	mg/dL	107	323,49	58,56
	Haptoglobina	mg/dL	105	100,42	46,50
	Ceruloplasmina	mg/dL	106	36,26	11,44
Metabolismo da Glicose	Glicémia	mg/dL	114	95,89	32,63
	Insulina	mU/mL	109	16,54	21,57
	Homa	mU/mL.mg/dL	98	0,50	2,09
	Péptido C	ng/mL	109	2,42	2,02
	Actividade ECA	U/L	49	19,58	6,11

Tabela 3.3. – Características antropométricas, sociodemográficas, bioquímicas e histológicas (variáveis categóricas)

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	Valores Referência	N	%	Total
Sexo		Masculino	67	53,60	125
		Feminino	58	46,40	
IMC	Kg/m ²	< 25	56	53,33	105
		≥ 25	49	46,67	
RNA	UI/mL	< 400000	30	26,32	114
		≥ 400000	84	73,68	
		< 600000	36	31,58	114
		≥ 600000	78	68,42	
Plaquetas	U/mm ³	< 150000	28	24,35	115
		≥ 150000	87	75,65	
Fosfatase Alcalina	UI/mL	≤ 129	106	92,98	114
		> 129	8	7,02	
AST	UL/mL	≤ 34	27	23,28	116
		> 34	89	76,72	
ALT	UL/mL	≤ 49	47	40,52	116
		> 49	69	59,48	
GAMA GT	UL/mL	≤ 37	35	30,17	116
		> 37	81	69,83	
Colesterol total	mmol/L	< 4,92	81	71,68	113
		≥ 4,92	32	28,32	
HDL	mmol/L	≤ 1,04	97	87,39	111
		> 1,04	14	12,61	
LDL	mmol/L	< 2,8	76	70,37	108
		≥ 2,8	32	29,63	
Triglicéridos	mmol/L	< 1,69	101	88,60	114
		≥ 1,69	13	11,40	
APOA1	g/L	≤ 205	116	92,80	125
		> 205	9	7,20	
Ferro	mg/dL	≤ 175	95	84,82	112
		> 175	17	15,18	
Ferritina	mg/dL	≤ 332	83	74,11	112
		> 332	29	25,89	
Saturação	%	≤ 40	66	57,39	115
		> 40	49	42,61	
Transferrina	mg/dL	≤ 450	105	98,13	107
		> 450	2	1,87	
Haptoglobina	mg/dL	≤ 200	121	96,80	125
		> 200	4	3,20	
Ceruloplasmina	mg/dL	≤ 58	104	98,11	106
		> 58	2	1,89	
Glicemia	mg/dL	≤ 110	101	88,60	114
		> 110	13	11,40	
Insulina	mU/mL	≤ 25	95	87,16	109
		> 25	14	12,84	
Homa	mU/mL.mg/dL	≤ 2	92	93,88	98
		> 2	6	6,12	
Péptido C	ng/mL	≤ 3,9	100	91,74	109
		> 3,9	9	8,26	
Fibrose Hepática	kPa	F1 (Fibrose Ligeira)	30	27,03	111
		F2 (Fibrose Moderada)	42	37,84	
		F3 (Fibrose Intensa)	7	6,31	
		F4 (Cirrose)	32	28,83	

3.2. Estudo Genético

O estudo genético foi feito a partir dos testes laboratoriais que aqui se apresentam em esquema (Figura 3.1.).

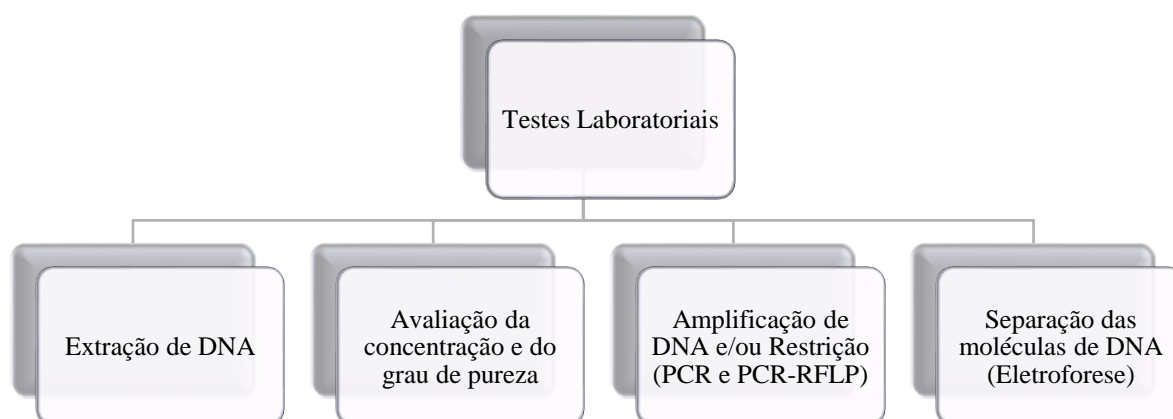


Figura 3.1. - Esquema representativo de técnicas aplicadas.

3.2.1. Extração de DNA genómico

Extração de DNA a partir de sangue total

O DNA genómico foi extraído de sangue total utilizando um método de extração não enzimático, previamente otimizado no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Lisboa e adaptado do método descrito por *Lahiri e Nurnberger* ^[168] (Anexo 1).

O DNA foi extraído de sangue periférico e colhido num tubo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e armazenado a -20°C até ao momento da extração de DNA.

3.2.2. Quantificação do DNA extraído e análise do grau de pureza

A concentração e a pureza do DNA são determinadas por densidade ótica, com recurso a um espectrofotómetro de espectro completo (NanoDrop® ND-1000, Thermo Scientific).

O procedimento para a quantificação do DNA consiste primeiramente em calibrar o aparelho com 1µL de branco (TE) e posteriormente utilizar 1µL de amostra de DNA a quantificar. A leitura da absorvância é efetuada a 260 nm e 280 nm, comprimentos de onda a que os ácidos nucleicos e as proteínas absorvem a luz.

A relação entre Abs260nm e Abs280nm (Abs260/Abs280) fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. Uma amostra de DNA é considerada pura se apresenta uma razão à volta de 1,8. Se a razão apresentar valores inferiores podem indicar a existência de contaminação por proteínas e valores superiores indicam uma possível contaminação por RNA ou solventes.

3.2.3. Amplificação de DNA

Os polimorfismos genéticos I/D do gene da enzima conversora da angiotensina (ECA), A1166C do gene do recetor 1 da angiotensina II (AT1), T174M do gene do angiotensinogénio (AGT) e AT-6 G/A também do gene do angiotensinogénio (AGT) serão avaliados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A técnica de PCR foi desenvolvida na década de 1980 por Kary Mullis ^[169].

É uma técnica de laboratório para replicação do DNA que permite que uma sequência de DNA “alvo” seja seletivamente amplificada. Pode usar-se apenas uma pequena quantidade de amostra de DNA a ser clonada e amplificá-la em milhões de cópias num curto espaço de tempo.

Requer quatro componentes primários: DNA polimerase (*Taq* DNA polimerase), nucleótidos (dNTP's- desoxirribonucleotídeos fosfatados), amostra de DNA a ser amplificada e *primers* específicos ^[170].

Esta técnica divide-se em três fases que se repetem genericamente por 25 a 35 ciclos (Figura 3.2.):

- desnaturação – é necessária uma temperatura elevada para separar ou desnaturar as cadeias de DNA. Isso fornece um molde de DNA de cadeia simples para a próxima etapa.
- emparelhamento – existe uma diminuição da temperatura para que os *primers* se possam ligar às suas sequências complementares de DNA de cadeia simples.
- extensão – ocorre um aumento da temperatura para que a *Taq* DNA Polimerase sintetize as novas cadeias de DNA.

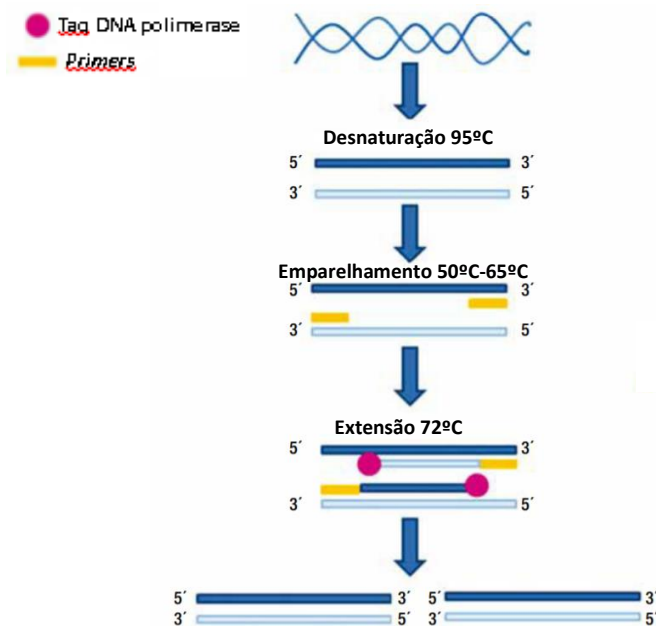


Figura 3.2. - Esquema geral dos passos da reação de PCR.
Adaptado de Pacheco A. (2013) ^[171]

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A técnica de polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), baseia-se na hidrólise do DNA com enzimas de restrição e posterior separação, por eletroforese, dos fragmentos gerados, originando assim padrões de restrição específicos (Figura 3.3.).

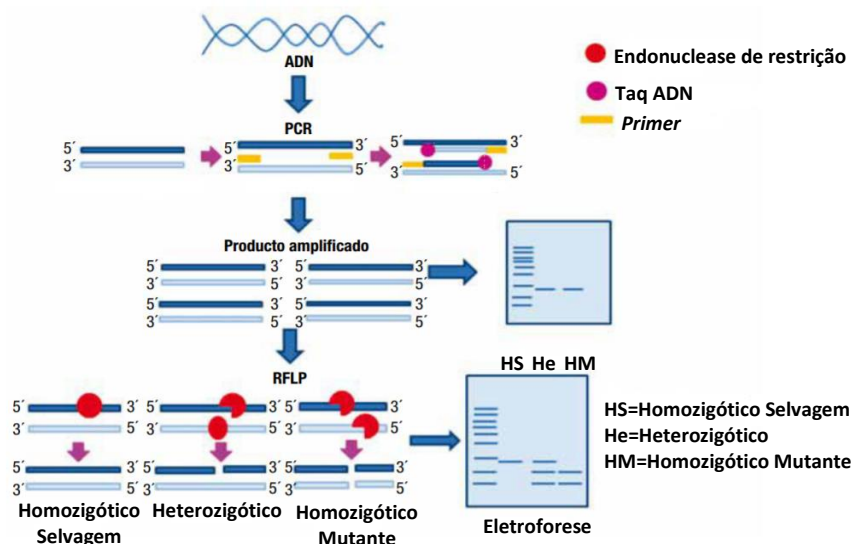


Figura 3.3. - Esquema geral da análise de polimorfismos por meio de PCR-RFLP.
Adaptado de Pacheco A. (2013) ^[171]

3.2.4. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese é uma técnica usada para separar fragmentos de DNA de acordo com o seu tamanho. As moléculas de DNA são separadas por tamanho, com o auxílio de um campo elétrico. Como estas moléculas estão negativamente carregadas migram em direção ao polo positivo. O fluxo de migração é determinado apenas pelo peso molecular, verificanda-se que as moléculas de peso pequeno migram mais rápido do que as maiores (Figura 3.4.) ^[172].

Neste estudo, os produtos de amplificação e digestão serão separados por eletroforese em gel de agarose em tampão TBE

(Tris-borato-EDTA) com brometo de etídio. Este é utilizado como corante específico do DNA porque tem a capacidade de se intercalar entre os pares de bases. Ao ser exposto a radiação ultra-violeta (UV), o brometo de etídio emite fluorescência e cora o DNA.

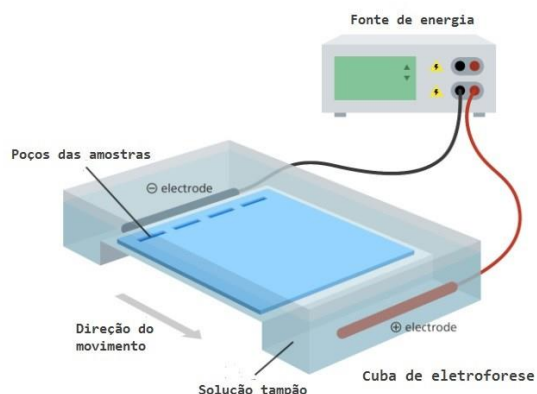


Figura 3.4. - Esquema representativo da técnica de eletroforese. ^[173]

3.3. Polimorfismos estudados

No trabalho desenvolvido foram estudados quatro polimorfismos genéticos.

O polimorfismo de inserção/deleção (I/D), no gene que codifica a ECA, consiste numa inserção (I), de uma sequência Alu de 287 pb de DNA, no intrão 16 do gene.

O polimorfismo A1166C que se localiza na região 3'UTR do gene recetor AT1, caracteriza-se pela alteração de uma adenina (A) por uma citosina (C) na posição 1166.

O polimorfismo T174M, variante do gene AGT, representa uma substituição de uma citosina (C) por uma timina (T), no exão 2 do gene. Como consequência existe uma troca funcional de treonina (T) para metionina (M) no codão 207 (denominado T207M ou T174M).

Numa outra variante do gene AGT, -6G/A, verifica-se uma substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A), na posição -6.

A escolha dos *primers* e as condições de amplificação e de digestão para todos os polimorfismos, excepto para o I/D do gene ECA, foram desenvolvidas e optimizadas durante o desenvolvimento da tese.

Tabela 3.4. - Polimorfismos genéticos estudados, posição no cromossoma e respetiva substituição.

Polimorfismo	Cromossoma	Substituição	Alelos (Ancestral:Mutante)
ECA I/D (rs4646994)	17	¹ n.a.	Inserção/Deleção
AGTR1 A1166C (rs5186)	3	*86A> C	A:C
AGT T174M (rs4762)	1	207	C:T
AGT AT-6G/A (rs5051)	1	-44G> A	G:A

¹ n.a., não aplicável

Tabela 3.5. - Primers utilizados para amplificação dos fragmentos de interesse e respetivas bandas de amplificação.

Polimorfismos	Sequência de <i>Primers</i> (Amplificação)	Fragmento de Amplificação
ECA I/D	Forward: 5' – CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT – 3' Reverse: 5' – GATGTGGCCATCACATTTCGTCAGAT – 3'	190 pb
AT1 A1166C	Forward: 5' - GTAAGCTCATCCACCAAGAAG – 3' Reverse: 5' – GCAAGTGTAGCACAGTTGC – 3'	518 pb
AGT T174M	Forward: 5' – CAGGGCTGATAGCCAGGCCCA – 3' Reverse: 5' – GAGAGCCAGGCCCTGCACAAA – 3'	103 pb
AGT AT-6 G/A	Forward: 5' – GTCGCTTCTGGCATCTGTCCTTCT – 3' Reverse: 5' – CCCCCGGCTTACCTTCTGCT – 3'	193 pb

3.3.1. Polimorfismo I/D do gene da ECA

Amplificação do DNA genómico

A amplificação do DNA genómico efetua-se através da técnica de PCR – reação em cadeia da polimerase, num termociclador (*GeneAmp® PCR System 2700, AB Applied Biosystems*). A reação começa com um passo que pretende otimizar o rendimento do produto desejado, limitando a probabilidade de amplificação inespecífica (*HotStart*). Posteriormente esta prossegue com a repetição de três passos: desnaturação, emparelhamento e extensão, por vários ciclos. Em cada passo existem duas variáveis importantes a considerar: a temperatura e a duração.

Tabela 3.6. - Condições de amplificação e composição da reação de PCR para o polimorfismo ECA I/D.

Polimorfismo	Condições de Amplificação	Composição da Reação
ECA I/D	<i>HotStart</i> - 2 min, 94°C	200ng DNA (200/[DNA] _{ng/μL}) + H ₂ O até 10 μL
	40 ciclos	
	Desnaturação: 45s, 94°C Annealing: 45s, 65°C Extensão: 45s, 72°C	12,5 μL Mix Green Taq PCR Master Mix (Fermentas) 0,5 μL H ₂ O 10 pmol <i>Primer</i> Forward (diluído 10x) 10 pmol <i>Primer</i> Reverse (diluído 10x)
	1 ciclo Extensão final: 10 min, 72°C	

O produto da amplificação é analisado por eletroforese (*BIO-RAD Sub-Cell GT*) em gel de agarose a 2% (*SeaKem® LE Agarose, Lonza*), em tampão TBE 1x (GRiSP) e corado com 7 μL de brometo de etídio. Este é submetido a uma corrente de 120 V durante 60 minutos. Os fragmentos de amplificação são visualizados utilizando um transiluminador com luz UV (*GenoSmart, VWR*).

Tabela 3.7. - Variantes alélicas obtidas (fragmentos de amplificação), para o polimorfismo ECA I/D.

Genótipo	Fragmento de Amplificação
DD	190pb
ID	190pb 477pb
II	477pb

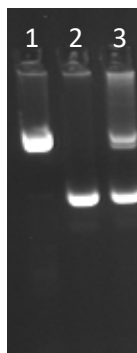


Figura 3.5. – Polimorfismo I/D do gene da ECA: produtos de amplificados por PCR, visualizados em gel de agarose a 2%. Nos poços 1 a 3 obtiveram-se os fragmentos de amplificação: II, DD, ID, respectivamente (marcador utilizado em anexo (2 - Figura Suplementar 8.1.)).

3.3.2. Polimorfismo A1166C do gene do AT1

Amplificação do DNA genómico

A amplificação faz-se conforme referido no ponto 3.3.1.

Tabela 3.8. - Condições de amplificação e composição da reação de PCR, para o polimorfismo AT1 A1166C.

Polimorfismo	Condições de Amplificação	Composição da Reação
AT1 A1166C	<i>HotStart</i> - 2 min, 94°C	200ng DNA (200/[DNA] _{ng/μL}) + H ₂ O até 10 μL
	40 ciclos Desnaturação: 30s, 94°C Annealing: 30s, 55°C Extensão: 1min, 72°C	25 μL Mix Green Taq PCR Master Mix (Fermentas) 13 μL H ₂ O 10 pmol <i>Primer</i> Forward (diluído 10x) 10 pmol <i>Primer</i> Forward (diluído 10x)
	1 ciclo Extensão final: 5 min, 72°C	

Genotipagem dos indivíduos

Os produtos de PCR que amplificaram são digeridos com 10 U de enzima de restrição (DdeI). A enzima reconhece o alelo C na sequência C*TNAG. Existe um corte que origina os fragmentos de 134pb e 384pb.

Tabela 3.9. - Condições utilizadas na determinação dos genótipos das variantes alélicas estudadas por RFLP, para o polimorfismo AT1 A1166C.

Polimorfismo	Condições de Restrição	Enzima de Restrição	Composição da Reação
AT1 A1166C	16h, 37°C	DdeI (HpyF3)	10μL Produto de PCR 17,5 μL H ₂ O 2μL Buffer (10x) 10 U Enzima

O produto resultante da digestão é analisado por eletroforese (*BIO-RAD Sub-Cell GT*) em gel de agarose a 3% (*SeaKem® LE Agarose, Lonza*), em tampão TBE 1x (*GRiSP*) e corado com 7 µL de brometo de etídio. Este é submetido a uma corrente de 130 V durante 60 minutos. Os fragmentos de restrição são visualizados utilizando um transiluminador com luz UV (*GenoSmart, VWR*).

Tabela 3.10. - Variantes alélicas obtidas (fragmentos de restrição), para o polimorfismo AT1 A1166C.

Genótipo	Fragmento de Digestão
AA	518pb
AC	518pb 384pb 134pb
CC	384pb 134pb

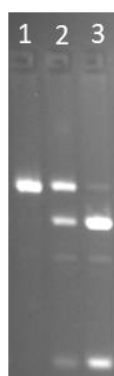


Figura 3.6. - Polimorfismo A1166C do gene do AT1: produtos amplificados por PCR-RFLP, visualizados em gel de agarose a 3%. Nos poços 1 a 3 obtiveram-se os fragmentos de digestão: AA, AC, CC, respetivamente (marcador utilizado em anexo (2 - Figura Suplementar 8.1.)).

3.3.3. Polimorfismo T174M do gene AGT

Amplificação do DNA genómico

A amplificação faz-se conforme referido no ponto 3.3.1.

Tabela 3.11. - Condições de amplificação e composição da reação de PCR, para o polimorfismo AGT T174M.

Polimorfismo	Condições de Amplificação	Composição da Reação
AGT T174M	HotStart - 2 min, 94°C	200ng DNA (200/[DNA] _{ng/µL}) + H ₂ O até 10 µL
	40 ciclos Desnaturação: 30s, 94°C Annealing: 30s, 64°C Extensão: 45s, 72°C	12,5 µL Mix Green Taq PCR Master Mix (Fermentas) 0,5 µL H ₂ O 10 pmol <i>Primer</i> Forward (diluído 10x) 10 pmol <i>Primer</i> Forward (diluído 10x)
	1 ciclo Extensão final: 5min, 72°C	

Genotipagem dos indivíduos

Os produtos de PCR que amplificaram são digeridos com 10 U de enzima de restrição (NcoI). A enzima reconhece o alelo T na sequência C*CATGG. Existe um corte que origina os fragmentos de 33pb e 70pb.

Tabela 3.12. - Condições utilizadas na determinação dos genótipos das variantes alélicas estudadas por RFLP, para o polimorfismo AGT T174M.

Polimorfismo	Condições de Restrição	Enzima de Restrição	Composição da Reação
AGT T174M	16h, 37°C	NcoI	10µL Produto de PCR 7 µL H ₂ O 2µL Buffer (10x) 10 U Enzima

O produto resultante da digestão é analisado por electroforese (*BIO-RAD Sub-Cell GT*) em gel de agarose a 3% (*SeaKem® LE Agarose, Lonza*), em tampão TBE 1x (GRiSP) e corado com 7 µL de brometo de etídio. Este é submetido a uma corrente de 130 V durante 90 minutos. Os fragmentos de restrição são visualizados utilizando um transiluminador com luz UV (*GenoSmart, VWR*).

Tabela 3.13. - Variantes alélicas obtidas (fragmentos de restrição), para o polimorfismo AGT T174M

Genótipo	Fragmento de Digestão
CC	103pb
CT	103pb 70pb 33pb
TT	70pb 33pb

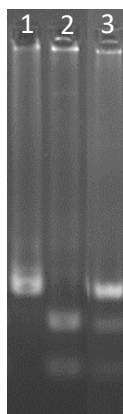


Figura 3.7. – Polimorfismo T174M do gene AGT: produtos amplificados por PCR-RFLP, visualizados em gel de agarose a 3%. Nos poços 1 a 3 obtiveram-se os fragmentos de digestão: CC, TT, CT, respetivamente (marcador utilizado em anexo (2 - Figura Suplementar 8.1.)).

3.3.4. Polimorfismo AT-6 G/A do gene AGT

Amplificação do DNA genómico

A amplificação faz-se conforme referido no ponto 3.3.1.

Tabela 3.14. - Condições de amplificação e composição da reação de PCR, para o polimorfismo AGT AT-6 G/A.

Polimorfismo	Condições de Amplificação	Composição da Reação
AGT AT-6 G/A	<i>HotStart</i> - 2 min, 94°C	200ng DNA (200/[DNA] _{ng/μL}) + H ₂ O até 10 μL
	40 ciclos Desnaturação: 30s, 94°C Annealing: 30s, 64°C Extensão: 1min, 72°C	25 μL Mix Green Taq PCR Master Mix (Fermentas) 13 μL H ₂ O 10 pmol <i>Primer</i> Forward (diluído 10x) 10 pmol <i>Primer</i> Forward (diluído 10x)
	1 ciclo Extensão final: 5min, 72°C	

Genotipagem dos indivíduos

Os produtos de PCR que amplificaram são digeridos com 10 U de enzima de restrição (*MvaI*). A enzima reconhece o alelo A na sequência CC*AGG. Existe um corte que origina os fragmentos de 53pb e 55pb. Existe um segundo local de corte na sequência CC*TGG, para todos os indivíduos, que origina o fragmento 85pb.

Tabela 3.15. - Condições utilizadas na determinação dos genótipos das variantes alélicas estudadas por RFLP, para o polimorfismo AGT AT-6 G/A.

Polimorfismo	Condições de Restrição	Enzima de Restrição	Composição da Reação
AGT AT-6 G/A	16h, 37°C	<i>MvaI</i> (BstNI)	10μL Produto de PCR 18μL H ₂ O 2μL Buffer R (10x) 10 U Enzima

O produto resultante da digestão é analisado por electroforese (*BIO-RAD Sub-Cell GT*) em gel de agarose a 3% (*SeaKem® LE Agarose, Lonza*), em tampão TBE 1x (*GRiSP*) e corado com 7 μL de brometo de etídio. Este é submetido a uma corrente de 130 V durante 60 minutos. Os fragmentos de restrição são visualizados utilizando um transiluminador com luz UV (*GenoSmart, VWR*).

Tabela 3.16. - Variantes alélicas obtidas (fragmentos de restrição), para o polimorfismo AGT AT-6 G/A.

Genótipo	Fragmento de Digestão
GG	108pb 85pb
GA	108pb 85pb 55pb 53pb
AA	85pb 55pb 53pb



Figura 3.8. - Polimorfismo AT-6 G/A do gene AGT: produtos amplificados por PCR-RFLP, visualizados em gel de agarose a 3%. Nos poços 1 a 3 obtiveram-se os fragmentos de digestão: GA, AA, GG, respetivamente (marcador utilizado em anexo (2 - Figura Suplementar 8.1.)).

3.4. Determinação da atividade da ECA sérico – Espectrofotometria

A atividade da ECA sérico será determinada para investigar os possíveis efeitos dos níveis séricos de ECA no grau de fibrose em doentes com fibrose hepática em indivíduos com hepatite C crónica.

Colheita de soros

Os soros foram obtidos por centrifugação a 720×g durante 10 minutos de sangue periférico humano colhido em tubos secos, e armazenados a -20°C.

A atividade da ECA sérico foi determinada espectrofotometricamente a 37°C, seguindo o decréscimo de absorvância a $\lambda = 346$ nm do FAPGG, durante 15 min, sendo as misturas reacionais constituídas por 50 μ L de soro e e FAPGG 0,8 mM em HEPES 25 mM, NaCl 0,3 M, pH 8,1 num volume final de 750 μ L, utilizando como referência 50 μ L de soro em HEPES 25 mM, NaCl 0,3 M, pH 8,1, num volume final de 750 μ L.

A atividade do ECA sérico, em Unidades/litro, foi calculada recorrendo à Lei de Lambert-Beer, utilizando ϵ_{346} (FAPGG) = 1,010055 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$:

$$A = \epsilon l C = \frac{\Delta A}{\text{min}} = \epsilon l \frac{\Delta C}{\text{min}} = \frac{\mu\text{mol/ml}}{\text{min}} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times \frac{1}{\epsilon l}$$

$$U/L = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times \frac{1}{1,010055 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1} \times 1 \text{cm}} \times 15.000 \Leftrightarrow$$
$$U/L = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times 14,850,68$$

A - Absorvância

ϵ – Coeficiente de absortividade molar ($\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$)

l – Percorso ótico (espessura da célula em que está contida a amostra, cm)

C – Concentração do composto em solução (mol L^{-1})

3.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software *IBM SPSS Statistics*, versão 25.

Após a realização dos estudos clínicos/genéticos, inseriram-se os resultados obtidos numa base de dados construída no programa SPSS 25.0, onde se protegeu a identidade de todos os doentes e todas as informações recolhidas dos mesmos.

Definiu-se um nível de confiança de 95% para os testes efetuados sendo considerados resultados estatisticamente significativos quando estes apresentavam um *p-value* <0,05.

Em relação aos polimorfismos genéticos analisados, quando estes geraram três genótipos, foram avaliados estatisticamente como três grupos diferentes (modelo codominante), isto é, tendo-se em conta os três genótipos separados. Posteriormente, agrupou-se o genótipo heterozigoto com o genótipo homozigótico selvagem (modelo dominante) ou com o genótipo mutado (modelo recessivo).

Efectuaram-se as estatísticas descritivas dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos, bioquímicos e histológicos. As variáveis contínuas foram testadas para a sua normalidade através do teste não paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov*. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal sendo descritas usando média e desvio padrão [média \pm d.p]. As variáveis antropométricas e bioquímicas foram tratadas como variáveis contínuas ou categóricas segundo os valores de referência para cada parâmetro.

As variáveis categóricas foram descritas usando frequência relativa e percentagem.

Na análise bivariada, e uma vez que todas as variáveis contínuas apresentaram uma distribuição normal, as comparações estatísticas foram realizadas através dos testes T de amostras independentes (testes paramétricos *T-Student*), teste *ANOVA* (análise de variância) com comparações múltiplas e correlações de Pearson. Para a estatística bivariada das variáveis categóricas foi usado o teste do *Qui-Quadrado* de Pearson e foi calculado o *Odds Ratio* com o respetivo intervalo de confiança.

Relativamente às frequências genótípicas observadas, estas foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) pelo teste do *Qui-Quadrado* de Pearson.

4. Resultados

4.1. Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos estudados

As tabelas 4.1 a 4.4 resumem as frequências alélicas e genótípicas para cada um dos polimorfismos estudados na população de controlo e a significância estatística para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4.1. - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo I/D do gene ECA na população de controlo.

Polimorfismo	N	Genótipo			Alelo		ρ^*
		II	ID	DD	Alelo I	Alelo D	
ECA	136	15 11,0%	64 47,1%	57 41,9%	94 34,6%	178 65,4%	0,638

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Hardy-Weinberg

Tabela 4.2. - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo A1166C do gene AGTR1 na população de controlo.

Polimorfismo	N	Genótipo			Alelo		ρ^*
		AA	AC	CC	Alelo A	Alelo C	
AGTR1 A1166C	136	63 46,3%	66 48,5%	7 5,1%	192 70,6%	80 29,4%	0,051

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Hardy-Weinberg

Tabela 4.3. - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo T174M do gene AGT na população de controlo.

Polimorfismo	N	Genótipo			Alelo		ρ^*
		CC	CT	TT	Alelo C	Alelo T	
AGT T174M	136	108 79,4%	26 19,1%	2 1,5%	242 89,0%	30 11,0%	0,763

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Hardy-Weinberg

Tabela 4.4. - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo A-6G do gene AGT na população de controlo.

Polimorfismo	N	Genótipo			Alelo		ρ^*
		GG	GA	AA	Alelo G	Alelo A	
AGT AT-6G/A	136	57 41,9%	58 42,6%	21 15,4%	172 63,2%	100 36,8%	0,334

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Hardy-Weinberg

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($\rho > 0,05$) entre as distribuições genótípicas dos polimorfismos suprarreferidos nas tabelas e a distribuição prevista pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.2. Relação dos polimorfismos estudados com a susceptibilidade para a HCC

Utilizou-se o teste de independência do qui-quadrado de Pearson para identificar possíveis diferenças estatisticamente significativas entre as distribuições genótípicas e alélicas dos polimorfismos estudados da população com HCC e da população controle (Tabelas 4.5. a 4.8. e figuras 4.1 a 4.4.).

Tabela 4.5. - Avaliação da associação do polimorfismo I/D do gene ECA com a HCC.

ECA	N	Genótipo			ρ^*	Alelo		ρ^{**}
		II	ID	DD		Alelo I	Alelo D	
Doença	125	11 8,8%	55 44,0%	59 47,2%	0,648	77 30,8%	173 69,2%	0,361
Controlo	136	15 11,0%	64 47,1%	57 41,9%		94 34,6%	178 65,4%	

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Distribuição genotípica

** Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Distribuição alélica

Na tabela 4.5. avalia-se a relação do polimorfismo I/D do gene ECA com a HCC, não se verifica qualquer diferença estatisticamente significativa entre as distribuições genótípicas e alélicas dos doentes e dos controlos.

Na figura 4.1. mostra-se em gráfico as diferenças de comportamento divididos por alelos e por genótipo.

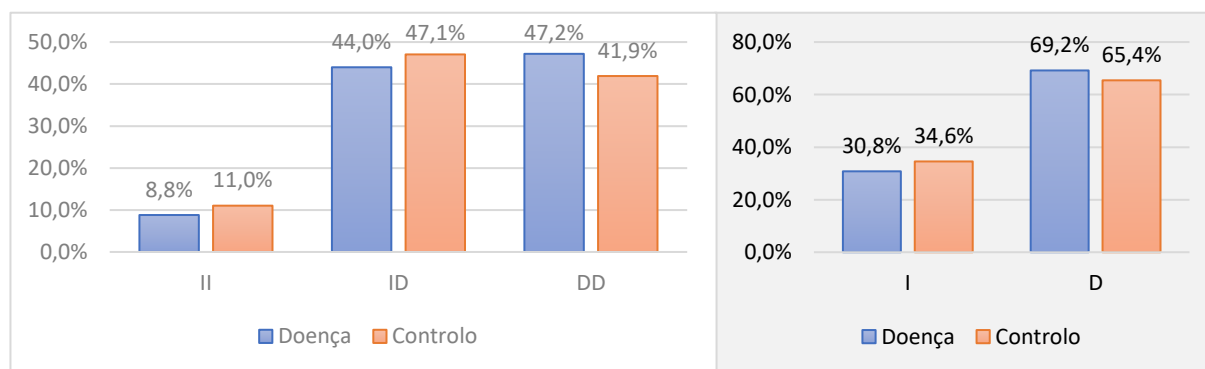


Figura 4.1. - Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo I/D do gene ECA: População com HCC versus Controlos.

Tabela 4.6. - Avaliação da associação do polimorfismo A1166C do gene AGTR1 com a HCC.

AGTR1 A1166C	N	Genótipo			ρ^*	Alelo		ρ^{**}
		AA	AC	CC		Alelo A	Alelo C	
Doença	125	67 53,6%	53 42,4%	5 4,0%	0,493	187 74,8%	63 25,2%	0,281
Controlo	136	63 46,3%	66 48,5%	7 5,1%		192 70,6%	80 29,4%	

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Distribuição genotípica

** Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Distribuição alélica

Na tabela 4.6. avalia-se a relação do polimorfismo A1166C do gene AGTR1 com a HCC, não se verifica qualquer diferença estatisticamente significativa entre as distribuições genotípicas e alélicas dos doentes e dos controlos.

Na figura 4.2. mostra-se em gráfico as diferenças de comportamento divididos por alelos e por genótipo.

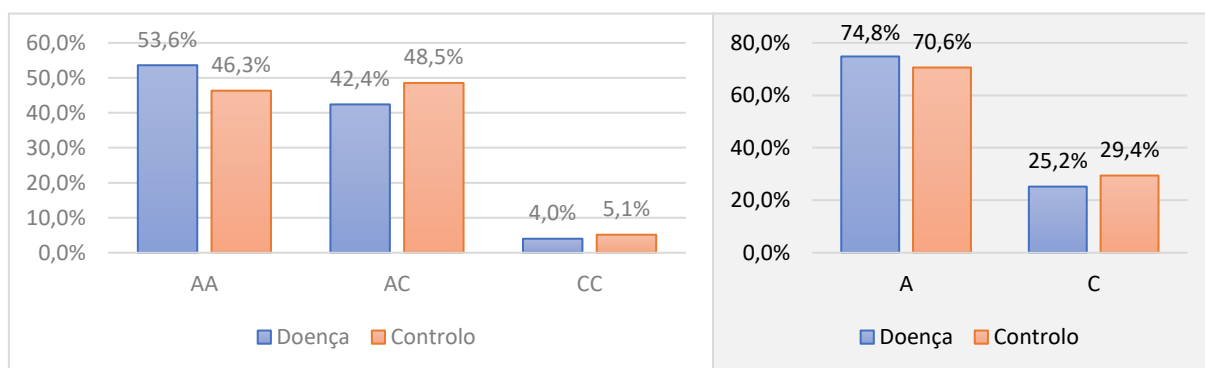


Figura 4.2. - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo A1166C do gene AGTR1: População com HCC versus Controlos.

Tabela 4.7. - Avaliação da associação do polimorfismo T174M do gene AGT com a HCC.

AGT T174M	N	Genótipo			ρ^*	Alelo		ρ^{**}
		CC	CT	TT		Alelo C	Alelo T	
Doença	125	97 77,6%	25 20,0%	3 2,4%	0,841	219 87,6%	31 12,4%	0,626
Controlo	136	108 79,4%	26 19,1%	2 1,5%		242 89,0%	30 11,0%	

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Distribuição genotípica

** Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Distribuição alélica

Na tabela 4.7. avalia-se a relação do polimorfismo T174M do gene AGT com a HCC, não se verifica qualquer diferença estatisticamente significativa entre as distribuições genotípicas e alélicas dos doentes e dos controlos.

Na figura 4.3. mostra-se em gráfico as diferenças de comportamento divididos por alelos e por genótipo.

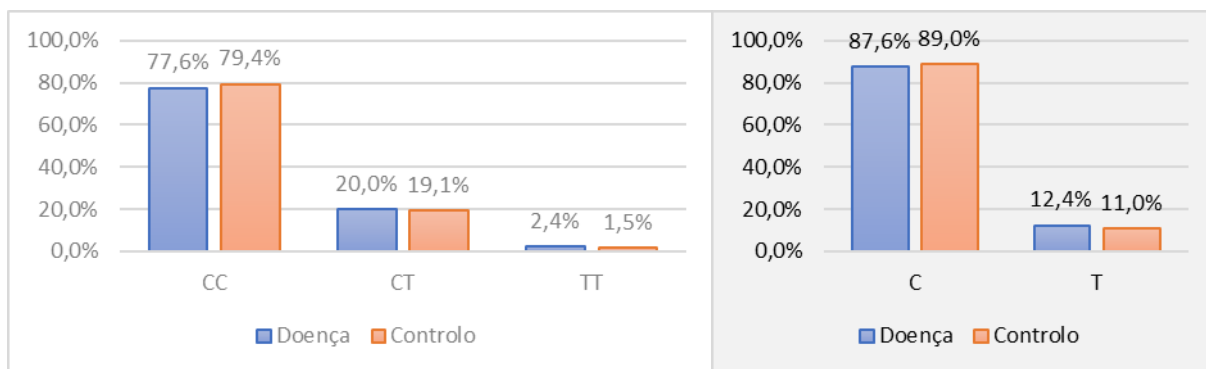


Figura 4.3. - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo T174M do gene AGT: População com HCC versus Controlos.

Tabela 4.8. - Avaliação da associação do polimorfismo A-6G do gene promotor do AGT com a HCC.

AGT AT-6G/A	N	Genótipo			ρ^*	Alelo		ρ^{**}
		GG	GA	AA		Alelo G	Alelo A	
Doença	125	40 32,0%	59 47,2%	26 20,8%	0,216	139 55,6%	111 44,4%	0,076
Controlo	136	57 41,9%	58 42,6%	21 15,4%		172 63,2%	100 36,8%	

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Distribuição genotípica

** Teste de independência do qui-quadrado de Pearson - Distribuição alélica

Na tabela 4.8. avalia-se a relação do polimorfismo A-6G do gene AGT com a HCC, não se verifica qualquer diferença estatisticamente significativa entre as distribuições genotípicas e alélicas dos doentes e dos controlos.

Na figura 4.4. mostra-se em gráfico as diferenças de comportamento divididos por alelos e por genótipo.

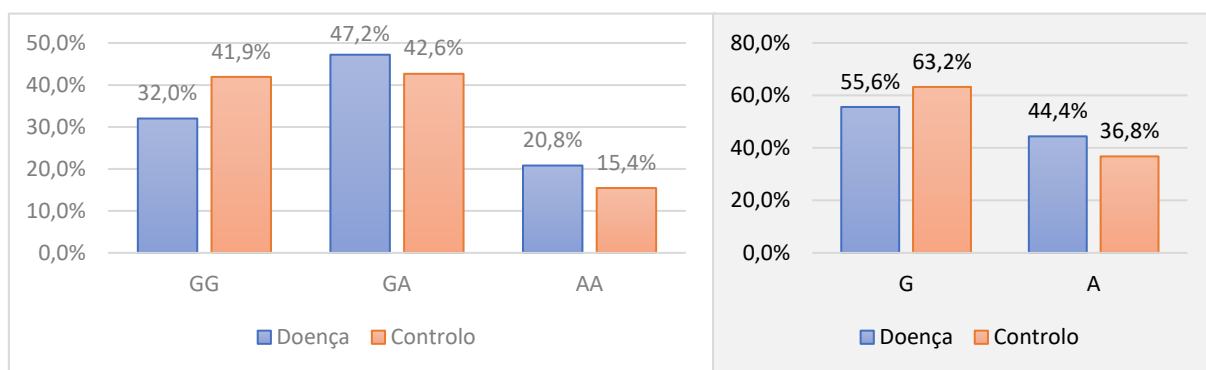


Figura 4.4. - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo A-6G do gene AGT: População com HCC versus Controlos.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as distribuições genotípicas e alélicas dos doentes e dos controlos, para nenhum dos polimorfismos.

4.3. Relação da actividade da ECA com a HCC

Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o valor médio do parâmetro Atividade da ECA na população com HCC e na população de controlo. Este parâmetro apresenta um valor médio mais elevado nos doentes comparativamente com o valor médio dos controlos.

Tabela 4.9. - Avaliação da relação do parâmetro Atividade do ECA com a HCC.

Atividade ECA	N	Média (U/L)	Desvio Padrão (U/L)	Variâncias iguais assumidas*	ρ^{**}
Doença	49	19,58	6,11	Sim	< 0,001
Controlo	50	10,33	5,00		

* Teste de Levene para igualdade de variâncias

** Teste T para amostras independentes

4.4. Relação dos polimorfismos estudados com o grau de fibrose

Aplicou-se o teste de independência do qui-quadrado de Pearson para identificar possíveis associações entre os polimorfismos estudados e o grau de fibrose (Tabela 4.10.). Agruparam-se os indivíduos com fibrose ligeira (F1) e fibrose moderada (F2) e os indivíduos com fibrose intensa (F3) e cirrose (F4), para que as frequências por genótipo não fossem demasiado baixas.

Tabela 4.10. - Avaliação da relação dos polimorfismos estudados (genótipos) com o grau de fibrose na população com HCC.

Polimorfismo	Genótipo	Grau de Fibrose				ρ^*
		F1/2	%	F3/4	%	
ECA	II	6	8,33	4	10,26	0,856
	ID	29	40,28	17	43,59	
	DD	37	51,39	18	46,15	
AGTR1 A1166C	AA	41	56,94	17	43,59	0,231
	AC	27	37,50	21	53,85	
	CC	4	5,56	1	2,56	
AGT T174M	CC	52	72,22	32	82,05	0,313
	CT	17	23,61	7	17,95	
	TT	3	4,17	0	0,00	
AGT AT-6G/A	GG	20	27,78	16	41,03	0,300
	GA	37	51,39	18	46,15	
	AA	15	20,83	5	12,82	

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson

Não foram encontradas relações de dependência entre o grau de fibrose e os genótipos estudados.

Tabela 4.11. - Avaliação da relação dos polimorfismos estudados (genótipos agrupados) na variação do grau de fibrose na população com HCC.

Polimorfismo	Genótipo	Grau de Fibrose				ρ^*
		F 1/2	%	F3/4	%	
ECA	DD ou ID	66	91,67	35	89,74	0,735
	II	6	8,33	4	10,26	
	II ou ID	35	48,61	21	53,85	0,598
	DD	37	51,39	18	46,15	
AGTR1 A1166C	CC ou AC	31	43,06	22	56,41	0,179
	AA	41	56,94	17	43,59	
	AA ou AC	68	94,44	38	97,44	0,468
	CC	4	5,56	1	2,56	
AGT T174M	TT ou CT	20	27,78	7	17,95	0,249
	CC	52	72,22	32	82,05	
	CC ou CT	69	95,83	39	100,00	0,196
	TT	3	4,17	0	0,00	
AGT AT-6G/A	AA ou GA	52	72,22	23	58,97	0,155
	GG	20	27,78	16	41,03	
	GG ou GA	57	79,17	34	87,18	0,294
	AA	15	20,83	5	12,82	

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson

Não foram encontradas relações de dependência entre o grau de fibrose e os genótipos estudados quando foram aplicados os modelos dominante e recessivo.

4.5. Relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos com o grau de fibrose

Recorreu-se ao teste do qui-quadrado de Pearson para identificar possíveis associações entre os parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados e o grau de fibrose (Tabela 4.12.). Os parâmetros foram codificados em variáveis categóricas segundo os valores de referência para cada parâmetro (Tabela 3.3.).

Tabela 4.12. - Avaliação da relação dos antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) e o grau de fibrose na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/Bioquímicos	Unidades de Medida	Valores Referência	Grau de Fibrose				ρ^*	Odds Ratio	IC 95%
			F 1/2	%	F3/4	%			
Sexo		Masculino	36	50,00	25	64,10	0,154	-	-
		Feminino	36	50,00	14	35,90			
IMC	Kg/m ²	< 25	35	53,00	20	55,60	0,807	-	-
		≥ 25	31	47,00	16	44,40			
RNA	UI/mL	< 400000	18	25,40	8	20,50	0,568	-	-
		≥ 400000	53	74,60	31	79,50			
		< 600000	22	31,00	10	25,60	0,555	-	-
		≥ 600000	49	69,00	29	74,40			
Plaquetas	U/mm ³	< 150000	9	12,50	17	43,60	0,000	5,409	[2,108; 13,882]
		≥ 150000	63	87,50	22	56,40			
Fosfatase Alcalina	UI/mL	≤ 129	71	98,60	32	84,20	0,019	13,312	[1,539; 115,174]
		> 129	1	1,40	6	15,80			
AST	UL/mL	≤ 34	23	31,90	3	7,70	0,008	5,633	[1,570; 20,213]
		> 34	49	68,10	36	92,30			
ALT	UL/mL	≤ 49	39	54,20	6	15,40	0,000	6,500	[2,426; 17,418]
		> 49	33	45,80	33	84,60			
GAMA GT	UL/mL	≤ 37	26	36,10	6	15,40	0,025	3,109	[1,151; 8,399]
		> 37	46	63,90	33	84,60			
Colesterol total	mmol/L	< 4,92	48	67,60	30	78,90	0,211	-	-
		≥ 4,92	23	32,40	8	21,10			
HDL	mmol/L	≤ 1,04	63	90,00	30	81,10	0,193	-	-
		> 1,04	7	10,00	7	18,90			
LDL	mmol/L	< 2,8	45	65,20	29	80,60	0,102	-	-
		≥ 2,8	24	34,80	7	19,40			
Triglicéridos	mmol/L	< 1,69	65	90,30	33	86,80	0,583	-	-
		≥ 1,69	7	9,70	5	13,20			
APOA1	g/L	≤ 205	64	88,90	38	97,40	0,115	-	-
		> 205	8	11,10	1	2,60			
Ferro	mg/dL	≤ 175	65	92,90	27	71,10	0,004	5,296	[1,680; 16,700]
		> 175	5	7,10	11	28,90			
Ferritina	mg/dL	≤ 332	58	82,90	22	57,90	0,006	3,515	[1,436; 8,603]
		> 332	12	17,10	16	42,10			
Saturação da Transferrina	%	≤ 40	41	59,40	19	52,80	0,796	-	-
		> 40	28	40,60	17	47,20			
Transferrina	mg/dL	≤ 450	67	100,00	34	94,40	0,051	-	-
		> 450	0	0,00	2	5,60			
Haptoglobina	mg/dL	≤ 200	69	95,80	39	100,00	0,196	-	-
		> 200	3	4,20	0	0,00			
Ceruloplasmina	mg/dL	≤ 58	65	97,00	37	100,00	0,289	-	-
		> 58	2	3,00	0	0,00			
Glicemia	mg/dL	≤ 110	67	93,10	30	78,90	0,037	3,573	[1,079; 11,834]
		> 110	5	6,90	8	21,10			
Insulina	mU/mL	≤ 25	61	88,40	31	86,10	0,735	-	-
		> 25	8	11,60	5	13,90			
Homa	mU/mL.mg/dL	≤ 2	60	95,20	29	90,60	0,382	-	-
		> 2	3	4,80	3	9,40			
Péptido C	ng/mL	≤ 3,9	64	92,80	33	89,20	0,530	-	-
		> 3,9	5	7,20	4	10,80			

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson

Verificaram-se resultados estatisticamente significativos, para os parâmetros: plaquetas, fosfatase alcalina, AST, ALT, GGT, ferro, ferritina e glicemia.

- **Plaquetas:** os indivíduos com um valor inferior ao valor de referência (<150000) têm 5,4 vezes mais risco de apresentar um grau de fibrose F3/4 do que os indivíduos dentro do valor de referência (≥ 150000);
- **Fosfatase alcalina:** os indivíduos com um valor superior a 129 UI/mL têm 13,31 vezes mais risco de apresentar um grau de fibrose F3/4 que os restantes (≤ 129 UI/mL);
- **AST:** os indivíduos com um valor superior a 34 UL/mL têm 5,63 vezes mais risco de apresentar de apresentar um grau de fibrose F3/4 que os restantes (≤ 34 UL/mL);
- **ALT:** os indivíduos com um valor superior a 49 UL/mL apresentam 6,5 vezes mais risco de apresentar de ter um grau de fibrose F3/4 do que os indivíduos dentro do valor de referência (≤ 49 UL/mL);
- **GGT:** 3,11 vezes mais risco de apresentar um grau de fibrose F3/4 para os indivíduos com um valor superior a 37 UL/mL;
- **Ferro:** 5,30 vezes mais risco de apresentar um grau de fibrose F3/4 para os indivíduos com um valor superior a 175 mg/dL;
- **Ferritina:** 3,51 vezes mais risco de apresentar um grau de fibrose F3/4 para os indivíduos com um valor superior a 332 mg/dL;
- **Glicémia:** 3,57 vezes mais risco de apresentar um grau de fibrose F3/4 para os indivíduos com um valor superior a 110 mg/dL.

Tabela 4.13. - Avaliação da relação dos antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) e o grau de fibrose na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	Grau de Fibrose	N	Média	Desvio Padrão	Variâncias iguais assumidas*	ρ^{**}
Idade	Anos	F 1/2	71	53,17	11,63	Sim	0,258
		F 3/4	39	55,85	12,12		
IMC	Kg/m ²	F 1/2	66	24,83	3,83	Não	0,198
		F 3/4	36	27,52	11,97		
RNA	UI/mL	F 1/2	71	1,94E+06	2,37E+06	Não	0,263
		F 3/4	39	3,02E+06	5,68E+06		
Plaquetas	U/mm ³	F 1/2	72	2,18E+05	5,87E+04	Não	0,006
		F 3/4	38	1,72E+05	8,82E+04		
Fosfatase Alcalina	UI/mL	F 1/2	72	72,19	21,80	Não	0,008
		F 3/4	38	94,58	46,97		
AST	UL/mL	F 1/2	72	43,85	18,88	Não	0,000
		F 3/4	39	76,28	34,88		
ALT	UL/mL	F 1/2	72	61,96	43,19	Sim	0,001
		F 3/4	39	94,59	56,22		
GAMA GT	UL/mL	F 1/2	72	59,86	46,32	Não	0,002
		F 3/4	39	127,03	125,82		
Colesterol total	mmol/L	F 1/2	71	4,50	0,84	Sim	0,081
		F 3/4	38	4,19	0,92		
HDL	mmol/L	F 1/2	70	1,55	0,53	Sim	0,914
		F 3/4	37	1,57	0,77		
LDL	mmol/L	F 1/2	69	2,55	0,85	Sim	0,037
		F 3/4	36	2,21	0,71		
Triglicéridos	mmol/L	F 1/2	72	1,11	0,66	Sim	0,461
		F 3/4	38	1,20	0,46		
APOA1	g/L	F 1/2	69	5,77	24,67	Não	0,160
		F 3/4	37	1,55	0,50		
Ferro	mg/dL	F 1/2	70	119,13	39,47	Não	0,032
		F 3/4	38	141,36	55,24		
Ferritina	mg/dL	F 1/2	70	220,11	144,49	Não	0,034
		F 3/4	38	321,38	266,36		
Saturação da Transferrina	%	F 1/2	69	37,54	12,53	Sim	0,229
		F 3/4	36	41,31	19,24		
Transferrina	mg/dL	F 1/2	67	310,18	51,92	Sim	0,008
		F 3/4	36	341,90	64,05		
Haptoglobina	mg/dL	F 1/2	65	106,78	41,66	Sim	0,022
		F 3/4	37	85,31	49,59		
Ceruloplasmina	mg/dL	F 1/2	67	36,99	11,92	Sim	0,266
		F 3/4	37	34,38	10,23		
Glicémia	mg/dL	F 1/2	72	92,10	25,94	Não	0,116
		F 3/4	38	104,26	42,97		
Insulina	mU/mL	F 1/2	69	13,66	12,82	Sim	0,147
		F 3/4	36	17,78	15,32		
Homa	mU/mL.mg/dL	F 1/2	63	0,27	0,89	Não	0,244
		F 3/4	32	1,00	3,42		
Péptido C	ng/mL	F 1/2	69	2,24	2,14	Sim	0,199
		F 3/4	37	2,78	1,85		
Atividade ECA	U/L	F 1/2	33	19,35	6,09	Sim	0,888
		F 3/4	12	19,64	5,61		

* Teste de Levene para igualdade de variâncias

** Teste T para amostras independentes

Pela análise da Tabela 4.13., podemos verificar diferenças significativas nas médias dos seguintes parâmetros para diferentes graus de fibrose: plaquetas, fosfatase alcalina, AST, ALT, GGT, LDL, ferro, ferritina, transferrina e haptoglobina.

Como seria expetável pelos valores anteriores (Tabela 4.12), o parâmetro bioquímico plaquetas, apresenta um valor médio mais baixo para níveis de fibrose F3/4 comparativamente com o valor médio

para níveis de fibrose F1/2, enquanto que os parâmetros fosfatase alcalina, AST, ALT, GGT, ferro e ferritina apresentam um valor médio mais elevado para níveis de fibrose F3/4 comparativamente ao seu valor médio para níveis de fibrose F1/2.

Os parâmetros LDL e haptoglobina, apresentam um valor médio mais baixo para o grau de fibrose F3/4 e o parâmetro transferrina apresenta um valor médio mais elevado para o grau de fibrose F3/4.

4.6. Relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos com os diferentes polimorfismos estudados na população com HCC

4.6.1. Relação dos genótipos do polimorfismo de I/D do gene ECA com os parâmetros bioquímicos

Para se identificar relações de dependência entre os parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos (variáveis categóricas) estudados e o polimorfismo ECA, recorreu-se ao teste do qui-quadrado (Tabela 4.14.). Agruparam-se os genótipos (II e ID), uma vez que o número de indivíduos em estudo detentores do genótipo II é muito pequeno (N=11), o que iria prejudicar a fiabilidade da análise do qui-quadrado, com muitas frequências inferiores a 5.

Não se verificam resultados estatisticamente significativos para nenhum dos parâmetros.

Tabela 4.14. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) com os genótipos (II ou ID *versus* DD) do gene ECA na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	Valores Referência	ECA				p*
			II ou ID (N)	%	DD (N)	%	
Sexo		Masculino	33	50,00	34	57,63	0,393
		Feminino	33	50,00	25	42,37	
IMC	Kg/m ²	< 25	26	48,15	30	58,82	0,273
		≥ 25	28	51,85	21	41,18	
RNA	UI/mL	< 400000	18	31,58	12	21,05	0,202
		≥ 400000	39	68,42	45	78,95	
		< 600000	21	36,84	15	26,32	0,227
		≥ 600000	36	63,16	42	73,68	
Plaquetas	U/mm ³	< 150000	12	20,69	16	28,07	0,357
		≥ 150000	46	79,31	41	71,93	
Fosfatase Alcalina	UI/mL	≤ 129	53	91,38	53	94,64	0,495
		> 129	5	8,62	3	5,36	
AST	UL/mL	≤ 34	14	24,14	13	22,41	0,826
		> 34	44	75,86	45	77,59	
ALT	UL/mL	≤ 49	23	39,66	24	41,38	0,850
		> 49	35	60,34	34	58,62	
GAMA GT	UL/mL	≤ 37	15	25,86	20	34,48	0,312
		> 37	43	74,14	38	65,52	
Colesterol total	mmol/L	< 4,92	41	73,21	40	70,18	0,720
		≥ 4,92	15	26,79	17	29,82	
HDL	mmol/L	≤ 1,04	48	87,27	49	87,50	0,971
		> 1,04	7	12,73	7	12,50	
LDL	mmol/L	< 2,8	41	75,93	35	64,81	0,206
		≥ 2,8	13	24,07	19	35,19	
Triglicéridos	mmol/L	< 1,69	49	85,96	52	91,23	0,377
		≥ 1,69	8	14,04	5	8,77	
APOA1	g/L	≤ 205	60	90,91	56	94,92	0,387
		> 205	6	9,09	3	5,08	
Ferro	mg/dL	≤ 175	49	84,48	46	85,19	0,918
		> 175	9	15,52	8	14,81	
Ferritina	mg/dL	≤ 332	42	72,41	41	75,93	0,672
		> 332	16	27,59	13	24,07	
Saturação da Transferrina	%	≤ 40	32	54,24	34	60,71	0,483
		> 40	27	45,76	22	39,29	
Transferrina	mg/dL	≤ 450	52	96,30	53	100,00	0,157
		> 450	2	3,70	0	0,00	
Haptoglobina	mg/dL	≤ 200	63	95,45	58	98,31	0,366
		> 200	3	4,55	1	1,69	
Ceruloplasmina	mg/dL	≤ 58	52	96,30	52	100,00	0,161
		> 58	2	3,70	0	0,00	
Glicemia	mg/dL	≤ 110	49	85,96	52	91,23	0,377
		> 110	8	14,04	5	8,77	
Insulina	mU/mL	≤ 25	48	84,21	47	90,38	0,336
		> 25	9	15,79	5	9,62	
Homa	mU/mL.mg/dL	≤ 2	42	89,36	50	98,04	0,073
		> 2	5	10,64	1	1,96	
Péptido C	ng/mL	≤ 3,9	52	91,23	48	92,31	0,838
		> 3,9	5	8,77	4	7,69	

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson

Efetuiu-se também, uma análise de variância simples (One-way ANOVA), para apurar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos (variáveis contínuas) para cada genótipo do gene ECA.

Tabela 4.15. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) do gene ECA na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	ECA	N	Média	Desvio Padrão	ρ*
Idade	Anos	II	10	53,40	13,53	0,894
		ID	48	53,77	12,02	
		DD	56	54,75	11,61	
IMC	Kg/m ²	II	9	33,99	22,29	0,003
		ID	45	25,05	4,25	
		DD	51	24,99	4,02	
RNA	UI/mL	II	10	1,33E+06	1,54E+06	0,400
		ID	47	1,87E+06	2,66E+06	
		DD	57	2,71E+06	4,81E+06	
Plaquetas	U/mm ³	II	10	2,31E+05	7,03E+04	0,381
		ID	47	2,04E+05	7,87E+04	
		DD	57	1,95E+05	7,39E+04	
Fosfatase Alcalina	UI/mL	II	10	77,20	37,21	0,734
		ID	48	82,83	28,30	
		DD	56	77,77	38,69	
AST	UI/mL	II	10	56,50	24,26	0,946
		ID	48	57,46	38,20	
		DD	57	55,39	26,60	
ALT	UI/mL	II	10	69,50	32,50	0,958
		ID	48	72,46	48,54	
		DD	57	74,23	54,73	
GAMA GT	UI/mL	II	10	118,50	137,60	0,392
		ID	48	81,15	89,14	
		DD	57	77,42	75,31	
Colesterol total	mmol/L	II	10	4,51	0,92	0,788
		ID	46	4,31	1,00	
		DD	57	4,39	0,86	
HDL	mmol/L	II	9	1,67	0,51	0,387
		ID	46	1,65	0,73	
		DD	56	1,49	0,54	
LDL	mmol/L	II	8	2,61	0,74	0,705
		ID	46	2,37	0,84	
		DD	54	2,46	0,81	
Triglicéridos	mmol/L	II	10	1,30	0,54	0,282
		ID	47	1,24	0,75	
		DD	57	1,07	0,46	
APOA1	g/L	II	10	1,68	0,33	0,373
		ID	46	1,66	0,48	
		DD	52	7,04	28,37	
Ferro	mg/dL	II	10	126,60	48,71	0,994
		ID	48	126,02	51,27	
		DD	54	127,02	43,51	
Ferritina	mg/dL	II	10	358,10	221,96	0,225
		ID	48	252,04	219,58	
		DD	54	238,72	176,25	

Saturação da Transferrina	%	II	11	39,18	12,88	0,848
		ID	48	39,46	17,95	
		DD	56	37,77	13,28	
Transferrina	mg/dL	II	10	307,40	50,26	0,437
		ID	44	331,14	60,80	
		DD	53	320,17	58,19	
Haptoglobina	mg/dL	II	10	106,30	38,79	0,545
		ID	46	104,86	49,93	
		DD	49	95,06	44,83	
Ceruloplasmina	mg/dL	II	10	38,40	19,18	0,514
		ID	44	37,28	13,23	
		DD	52	34,98	7,31	
Glicemia	mg/dL	II	10	109,50	55,25	0,388
		ID	47	94,83	29,62	
		DD	57	94,39	30,02	
Insulina	mU/mL	II	10	17,27	18,73	0,991
		ID	47	16,64	16,07	
		DD	52	16,32	26,27	
Homa	mU/mL.mg/dL	II	9	0,81	1,83	0,131
		ID	38	0,98	3,16	
		DD	51	0,10	0,45	
Péptido C	ng/mL	II	10	2,41	2,14	0,995
		ID	47	2,40	2,36	
		DD	52	2,44	1,68	
Atividade ECA	U/L	II	6	14,52	5,45	0,034
		ID	16	18,63	5,66	
		DD	27	21,27	5,95	

* One-way ANOVA

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros IMC e atividade da ECA (Tabela 4.15).

Tabela 4.16. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) com os genótipos (II ou ID *versus* DD) do gene ECA na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	ECA	N	Média	Desvio Padrão	Variâncias iguais assumidas*	ρ^{**}
Atividade ECA	U/L	II ou ID	22	17,51	5,78	Sim	0,031
		DD	27	21,27	5,95		

* Teste de Levene para igualdade de variâncias ** Teste T para amostras independentes *** Tabela completa em Anexo (Tabela Suplementar 8.2)

Agrupando-se os genótipos II e ID *versus* DD, no parâmetro atividade da ECA denota-se que os portadores dos genótipos DD apresentam um valor médio superior comparativamente aos genótipos II ou ID (Tabela 4.16).

4.6.2. Relação dos genótipos do polimorfismo AGTR1 A1166C com os parâmetros bioquímicos

Para se identificar relações de dependência entre os parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos (variáveis categóricas) estudados e o polimorfismo AGTR1 A1166C, recorreu-se ao teste do qui-quadrado (Tabela 4.17.). Agruparam-se os indivíduos portadores do alelo mutante (CC e AC), uma vez que o número de indivíduos em estudo detentores do genótipo CC é muito pequeno (N=5).

Tabela 4.17. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) com os genótipos (CC ou AC *versus* AA) do gene AGTR1 na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	Valores Referência	AGTR1 A1166C				p*	Odds Ratio	IC 95%
			CC ou AC (N)	%	AA (N)	%			
Sexo		Masculino	32	55,17	35	52,24	0,743	-	-
		Feminino	26	44,83	32	47,76			
IMC	Kg/m ²	< 25	27	54,00	29	52,73	0,896	-	-
		≥ 25	23	46,00	26	47,27			
RNA	UI/mL	< 400000	12	21,82	18	30,51	0,292	-	-
		≥ 400000	43	78,18	41	69,49			
		< 600000	15	27,27	21	35,59	0,340	-	-
		≥ 600000	40	72,73	38	64,41			
Plaquetas	U/mm ³	< 150000	12	21,82	16	26,67	0,545	-	-
		≥ 150000	43	78,18	44	73,33			
Fosfatase Alcalina	UI/mL	≤ 129	48	88,89	58	96,67	0,105	-	-
		> 129	6	11,11	2	3,33			
AST	UL/mL	≤ 34	9	16,36	18	29,51	0,094	-	-
		> 34	46	83,64	43	70,49			
ALT	UL/mL	≤ 49	22	40,00	25	40,98	0,914	-	-
		> 49	33	60,00	36	59,02			
GAMA GT	UL/mL	≤ 37	16	29,09	19	31,15	0,810	-	-
		> 37	39	70,91	42	68,85			
Colesterol total	mmol/L	< 4,92	37	67,27	44	75,86	0,311	-	-
		≥ 4,92	18	32,73	14	24,14			
HDL	mmol/L	≤ 1,04	47	87,04	50	87,72	0,914	-	-
		> 1,04	7	12,96	7	12,28			
LDL	mmol/L	< 2,8	41	77,36	35	63,64	0,118	-	-
		≥ 2,8	12	22,64	20	36,36			
Triglicéridos	mmol/L	< 1,69	51	92,73	50	84,75	0,180	-	-
		≥ 1,69	4	7,27	9	15,25			
APOA1	g/L	≤ 205	54	93,10	62	92,54	0,903	-	-
		> 205	4	6,90	5	7,46			
Ferro	mg/dL	≤ 175	45	81,82	50	87,72	0,384	-	-
		> 175	10	18,18	7	12,28			
Ferritina	mg/dL	≤ 332	40	72,73	43	75,44	0,743	-	-
		> 332	15	27,27	14	24,56			
Saturação da Transferrina	%	≤ 40	31	55,36	35	59,32	0,667	-	-
		> 40	25	44,64	24	40,68			
Transferrina	mg/dL	≤ 450	53	98,15	52	98,11	0,989	-	-
		> 450	1	1,85	1	1,89			
Haptoglobina	mg/dL	≤ 200	56	96,55	65	97,01	0,883	-	-
		> 200	2	3,45	2	2,99			
Ceruloplasmina	mg/dL	≤ 58	51	98,08	53	98,15	0,979	-	-
		> 58	1	1,92	1	1,85			
Glicemia	mg/dL	≤ 110	50	90,91	51	86,44	0,453	-	-
		> 110	5	9,09	8	13,56			
Insulina	mU/mL	≤ 25	46	88,46	49	85,96	0,697	-	-
		> 25	6	11,54	8	14,04			
Homa	mU/mL.mg/dL	≤ 2	46	93,88	46	93,88	1,000	-	-
		> 2	3	6,12	3	6,12			
Péptido C	ng/mL	≤ 3,9	49	92,45	51	91,07	0,793	-	-
		> 3,9	4	7,55	5	8,93			

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson

Não se verificaram diferenças estatísticas significativas para nenhum dos parâmetros.

Realizou-se também uma análise de variância simples (One-way ANOVA), para apurar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios dos parâmetros

antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos para cada genótipo do gene AGTR1, sendo que não se registraram resultados estatisticamente significativos (Tabela 4.18.)

Tabela 4.18. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) do gene AGTR1 na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/Bioquímicos	Unidades de Medida	AGTR1 A1166C	N	Média	Desvio Padrão	ρ^*
Idade	Anos	AA	59	53,53	12,64	0,797
		AC	50	54,86	11,40	
		CC	5	56,00	6,75	
IMC	Kg/m ²	AA	55	26,05	9,94	0,813
		AC	45	25,70	4,42	
		CC	5	23,73	2,01	
RNA	UI/mL	AA	59	2,00E+06	2,38E+06	0,540
		AC	50	2,65E+06	5,18E+06	
		CC	5	1,10E+06	1,02E+06	
Plaquetas	U/mm ³	AA	59	1,96E+05	6,69E+04	0,253
		AC	50	2,04E+05	8,44E+04	
		CC	5	2,53E+05	7,46E+04	
Fosfatase Alcalina	UI/mL	AA	60	79,25	37,65	0,895
		AC	49	81,16	32,00	
		CC	5	74,20	5,36	
AST	UI/mL	AA	60	55,27	33,46	0,457
		AC	50	59,14	30,06	
		CC	5	41,40	20,80	
ALT	UI/mL	AA	60	74,48	56,23	0,769
		AC	50	72,96	43,07	
		CC	5	57,40	48,48	
GAMA GT	UI/mL	AA	60	77,73	81,21	0,538
		AC	50	91,30	98,39	
		CC	5	52,80	26,78	
Colesterol total	mmol/L	AA	58	4,41	0,88	0,752
		AC	50	4,30	0,99	
		CC	5	4,53	0,66	
HDL	mmol/L	AA	57	1,60	0,66	0,895
		AC	49	1,55	0,60	
		CC	5	1,51	0,40	
LDL	mmol/L	AA	55	2,56	0,83	0,252
		AC	48	2,29	0,79	
		CC	5	2,48	0,75	
Triglicéridos	mmol/L	AA	59	1,20	0,74	0,712
		AC	50	1,11	0,43	
		CC	5	1,16	0,34	
APOA1	g/L	AA	55	4,71	22,98	0,945
		AC	49	3,95	16,64	
		CC	4	1,56	0,33	
Ferro	mg/dL	AA	57	122,66	41,96	0,674
		AC	50	130,70	53,91	
		CC	5	129,60	25,02	
Ferritina	mg/dL	AA	57	250,23	194,39	0,672
		AC	50	267,48	217,37	
		CC	5	186,52	56,94	
Saturação da Transferina	%	AA	59	37,22	13,54	0,609
		AC	51	40,10	17,67	
		CC	5	39,80	4,97	

Transferrina	mg/dL	AA	53	324,41	62,87	0,986
		AC	49	322,46	56,85	
		CC	5	323,80	26,23	
Haptoglobina	mg/dL	AA	54	100,08	48,41	0,491
		AC	47	98,51	45,20	
		CC	4	127,50	34,46	
Ceruloplasmina	mg/dL	AA	54	35,78	11,84	0,878
		AC	48	36,63	11,51	
		CC	4	38,25	4,11	
Glicemia	mg/dL	AA	59	97,00	36,38	0,827
		AC	50	94,02	28,89	
		CC	5	101,60	23,78	
Insulina	mU/mL	AA	57	19,35	27,95	0,357
		AC	48	13,66	10,70	
		CC	4	11,13	7,05	
Homa	mU/mL.mg/dL	AA	49	0,56	2,50	0,876
		AC	45	0,48	1,67	
		CC	4	0,00	0,00	
Péptido C	ng/mL	AA	56	2,43	2,26	0,740
		AC	49	2,47	1,82	
		CC	4	1,65	0,21	
Atividade ECA	U/L	AA	26	19,95	5,72	0,510
		AC	18	18,43	6,30	
		CC	5	21,78	7,92	

* One-way ANOVA

Ao juntar-se os detentores do genótipo CC com os do genótipo AC, também não se verificaram resultados estatisticamente significativos (Anexo 4 - Tabela Suplementar 8.3).

4.6.3. Relação dos genótipos do polimorfismo AGT T174M com os parâmetros bioquímicos

Para se identificar relações de dependência entre os parâmetros bioquímicos estudados e os genótipos do polimorfismo AGT T174M, recorreu-se ao teste do qui-quadrado (Tabela 4.19.). Agruparam-se os indivíduos portadores do alelo mutante (TT e CT), uma vez que o número de indivíduos em estudo detentores do genótipo TT é muito pequeno (N=3).

Tabela 4.19. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) com os genótipos (TT ou CT *versus* CC) do polimorfismo AGT T174M na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	Valores Referência	AGT T174M				p*	Odds Ratio	IC 95%
			TT ou CT (N)	%	CC (N)	%			
Sexo		Masculino	15	53,57	52	53,61	0,997	-	-
		Feminino	13	46,43	45	46,39			
IMC	Kg/m ²	< 25	19	70,37	37	47,44	0,043	2,632	[1,030; 6,724]
		≥ 25	8	29,63	41	52,56			
RNA	UI/mL	< 400000	5	17,86	25	29,07	0,242	-	-
		≥ 400000	23	82,14	61	70,93			
		< 600000	8	28,57	28	32,56	0,693	-	-
		≥ 600000	20	71,43	58	67,44			
Plaquetas	U/mm ³	< 150000	6	21,43	22	25,29	0,679	-	-
		≥ 150000	22	78,57	65	74,71			
Fosfatase Alcalina	UI/mL	≤ 129	27	96,43	79	91,86	0,411	-	-
		> 129	1	3,57	7	8,14			
AST	UL/mL	≤ 34	7	25,00	20	22,73	0,804	-	-
		> 34	21	75,00	68	77,27			
ALT	UL/mL	≤ 49	13	46,43	34	38,64	0,464	-	-
		> 49	15	53,57	54	61,36			
GAMA GT	UL/mL	≤ 37	8	28,57	27	30,68	0,832	-	-
		> 37	20	71,43	61	69,32			
Colesterol total	mmol/L	< 4,92	20	71,43	61	71,76	0,973	-	-
		≥ 4,92	8	28,57	24	28,24			
HDL	mmol/L	≤ 1,04	20	74,07	77	91,67	0,022	3,850	[1,210; 12,249]
		> 1,04	7	25,93	7	8,33			
LDL	mmol/L	< 2,8	19	73,08	57	69,51	0,729	-	-
		≥ 2,8	7	26,92	25	30,49			
Triglicéridos	mmol/L	< 1,69	24	85,71	77	89,53	0,581	-	-
		≥ 1,69	4	14,29	9	10,47			
APOA1	g/L	≤ 205	26	92,86	90	92,78	0,989	-	-
		> 205	2	7,14	7	7,22			
Ferro	mg/dL	≤ 175	23	88,46	72	83,72	0,555	-	-
		> 175	3	11,54	14	16,28			
Ferritina	mg/dL	≤ 332	20	76,92	63	73,26	0,708	-	-
		> 332	6	23,08	23	26,74			
Saturação da Transferrina	%	≤ 40	17	68,00	49	54,44	0,225	-	-
		> 40	8	32,00	41	45,56			
Transferrina	mg/dL	≤ 450	25	100,00	80	97,56	0,431	-	-
		> 450	0	0,00	2	2,44			
Haptoglobina	mg/dL	≤ 200	26	92,86	95	97,94	0,178	-	-
		> 200	2	7,14	2	2,06			
Ceruloplasmina	mg/dL	≤ 58	26	100,00	78	97,50	0,416	-	-
		> 58	0	0,00	2	2,50			
Glicemia	mg/dL	≤ 110	24	85,71	77	89,53	0,581	-	-
		> 110	4	14,29	9	10,47			
Insulina	mU/mL	≤ 25	25	92,59	70	85,37	0,330	-	-
		> 25	2	7,41	12	14,63			
Homa	mU/mL.mg/dL	≤ 2	26	96,30	66	92,96	0,538	-	-
		> 2	1	3,70	5	7,04			
Péptido C	ng/mL	≤ 3,9	22	84,62	78	93,98	0,130	-	-
		> 3,9	4	15,38	5	6,02			

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson

Analisando a Tabela 4.19., podemos observar diferenças significativas para o IMC e HDL. Os indivíduos com genótipo CC têm 2,63 vezes o risco de apresentar IMC igual ou superior a 25 Kg/m² comparativamente com os indivíduos TT ou CT. Por outro lado, relativamente ao parâmetro HDL, os

indivíduos portadores do alelo mutado (TT ou CT) têm 3,85 vezes o risco de apresentar valores iguais ou inferiores a 1,04 mmol/L comparativamente com os indivíduos homozigóticos para o alelo C.

Realizou-se uma análise de variância simples (One-way ANOVA), para apurar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) para cada genótipo do polimorfismo AGT T174M (Tabela 4.20.). Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa no parâmetro Transferrina ($p=0,047$).

Tabela 4.20. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) do polimorfismo AGT 174M na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	AGT T174M	N	Média	Desvio Padrão	ρ^*
Idade	Anos	CC	87	54,36	12,51	0,556
		CT	24	52,92	9,62	
		TT	3	60,67	8,08	
IMC	Kg/m ²	CC	78	26,28	8,62	0,540
		CT	25	24,38	4,27	
		TT	2	24,08	1,72	
RNA	UI/mL	CC	86	2,27E+06	4,13E+06	0,979
		CT	25	2,22E+06	2,97E+06	
		TT	3	1,80E+06	1,43E+06	
Plaquetas	U/mm ³	CC	86	1,99E+05	7,50E+04	0,648
		CT	25	2,05E+05	7,97E+04	
		TT	3	2,39E+05	7,48E+04	
Fosfatase Alcalina	UI/mL	CC	86	79,06	36,88	0,847
		CT	25	83,16	25,52	
		TT	3	75,00	27,62	
AST	UI/mL	CC	87	58,44	33,34	0,286
		CT	25	51,88	25,25	
		TT	3	33,00	10,58	
ALT	UI/mL	CC	87	75,28	51,63	0,370
		CT	25	70,04	47,28	
		TT	3	34,67	9,29	
GAMA GT	UI/mL	CC	87	90,13	97,50	0,194
		CT	25	63,52	37,02	
		TT	3	21,33	11,02	
Colesterol total	mmol/L	CC	85	4,35	0,98	0,261
		CT	25	4,32	0,68	
		TT	3	5,22	0,60	
HDL	mmol/L	CC	84	1,61	0,58	0,427
		CT	24	1,49	0,78	
		TT	3	1,23	0,18	
LDL	mmol/L	CC	82	2,42	0,84	0,194
		CT	23	2,38	0,59	
		TT	3	3,27	1,23	
Triglicéridos	mmol/L	CC	86	1,11	0,50	0,258
		CT	25	1,33	0,87	
		TT	3	1,28	0,53	
APOA1	g/L	CC	82	3,05	12,86	0,445
		CT	23	8,90	35,56	
		TT	3	1,37	0,13	

Ferro	mg/dL	CC	86	125,92	43,43	0,174
		CT	23	134,83	57,91	
		TT	3	81,33	41,10	
Ferritina	mg/dL	CC	86	265,25	216,77	0,626
		CT	23	220,90	136,97	
		TT	3	226,00	126,19	
Saturação da Transferrina	%	CC	90	38,86	14,27	0,391
		CT	22	39,23	19,12	
		TT	3	26,67	12,66	
Transferrina	mg/dL	CC	82	316,92	61,77	0,047
		CT	22	350,59	39,02	
		TT	3	304,33	28,54	
Haptoglobina	mg/dL	CC	79	95,93	44,08	0,224
		CT	23	114,65	54,94	
		TT	3	109,67	13,32	
Ceruloplasmina	mg/dL	CC	80	35,90	12,37	0,853
		CT	23	37,26	8,02	
		TT	3	38,00	9,64	
Glicemia	mg/dL	CC	86	96,15	35,69	0,988
		CT	25	95,24	22,21	
		TT	3	94,00	9,54	
Insulina	mU/mL	CC	82	17,62	24,46	0,659
		CT	24	13,46	7,56	
		TT	3	11,70	5,92	
Homa	mU/mL.mg/dL	CC	71	0,62	2,42	0,679
		CT	24	0,23	0,69	
		TT	3	0,00	0,00	
Péptido C	ng/mL	CC	83	2,26	1,94	0,236
		CT	23	3,06	2,36	
		TT	3	2,05	0,34	
Atividade ECA	U/L	CC	39	20,16	6,21	0,397
		CT	9	17,60	5,70	
		TT	1	14,85		

* One-way ANOVA

Agruparam-se os genótipos CT e TT versus CC e verificaram-se resultados significativos para os parâmetros GAMA GT e Transferrina (Tabela 4.21.). No parâmetro GAMA GT, observa-se que os indivíduos com o genótipo CC apresentam um valor médio superior aos restantes (CT ou TT). No parâmetro Transferrina os indivíduos portadores do genótipo CC apresentam valores médios inferiores comparativamente aos portadores dos genótipos CT ou TT.

Tabela 4.21. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) com os genótipos (CT ou TT *versus* CC) do polimorfismo AGT T174M na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	AGT T174M	N	Média	Desvio Padrão	Variâncias iguais assumidas*	ρ^{**}
GAMA GT	UL/mL	CT ou TT	28	59,00	37,46	Não	0,015
		CC	87	90,13	97,50		
Transferrina	mg/dL	CT ou TT	25	345,04	40,44	Não	0,010
		CC	82	316,92	61,77		

* Teste de Levene para igualdade de variâncias

** Teste T para amostras independentes

*** Tabela completa em Anexo

(Tabela Suplementar 8.4)

4.6.4. Relação dos genótipos do polimorfismo AGT AT-6G/A com os parâmetros bioquímicos

Para se identificar relações de dependência entre os parâmetros bioquímicos estudados e os genótipos do polimorfismo AGT AT-6G/A, recorreu-se ao teste do qui-quadrado (Tabela 4.22.). Não foram observados resultados estatisticamente significativos para nenhum dos parâmetros.

Tabela 4.22. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) com os genótipos do polimorfismo AGT AT-6G/A na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	Valores Referência	AGT AT-6G/A						p*
			GG (N)	%	GA (N)	%	AA (N)	%	
Sexo		Masculino	21	52,50	34	57,63	12	46,15	0,611
		Feminino	19	47,50	25	42,37	14	53,85	
IMC	Kg/m ²	< 25	13	40,63	35	64,81	8	42,11	0,052
		≥ 25	19	59,38	19	35,19	11	57,89	
RNA	UI/mL	< 400000	9	25,00	15	26,32	6	28,57	0,957
		≥ 400000	27	75,00	42	73,68	15	71,43	
		< 600000	11	30,56	18	31,58	7	33,33	0,977
		≥ 600000	25	69,44	39	68,42	14	66,67	
Plaquetas	U/mm ³	< 150000	9	24,32	13	22,81	6	28,57	0,871
		≥ 150000	28	75,68	44	77,19	15	71,43	
Fosfatase Alcalina	UI/mL	≤ 129	32	86,49	54	96,43	20	95,24	0,167
		> 129	5	13,51	2	3,57	1	4,76	
AST	UL/mL	≤ 34	8	21,05	12	21,05	7	33,33	0,484
		> 34	30	78,95	45	78,95	14	66,67	
ALT	UL/mL	≤ 49	14	36,84	24	42,11	9	42,86	0,852
		> 49	24	63,16	33	57,89	12	57,14	
GAMA GT	UL/mL	≤ 37	13	34,21	16	28,07	6	28,57	0,803
		> 37	25	65,79	41	71,93	15	71,43	
Colesterol total	mmol/L	< 4,92	24	66,67	44	78,57	13	61,90	0,254
		≥ 4,92	12	33,33	12	21,43	8	38,10	
HDL	mmol/L	≤ 1,04	31	86,11	48	88,89	18	85,71	0,897
		> 1,04	5	13,89	6	11,11	3	14,29	
LDL	mmol/L	< 2,8	23	65,71	39	75,00	14	66,67	0,596
		≥ 2,8	12	34,29	13	25,00	7	33,33	
Triglicéridos	mmol/L	< 1,69	34	94,44	48	84,21	19	90,48	0,305
		≥ 1,69	2	5,56	9	15,79	2	9,52	
APOA1	g/L	≤ 205	36	90,00	54	91,53	26	100,00	0,268
		> 205	4	10,00	5	8,47	0	0,00	
Ferro	mg/dL	≤ 175	31	83,78	46	83,64	18	90,00	0,776
		> 175	6	16,22	9	16,36	2	10,00	
Ferritina	mg/dL	≤ 332	29	78,38	40	72,73	14	70,00	0,747
		> 332	8	21,62	15	27,27	6	30,00	
Saturação da Transferrina	%	≤ 40	20	52,63	30	54,55	16	72,73	0,266
		> 40	18	47,37	25	45,45	6	27,27	
Transferrina	mg/dL	≤ 450	35	97,22	50	98,04	20	100,00	0,761
		> 450	1	2,78	1	1,96	0	0,00	
Haptoglobina	mg/dL	≤ 200	38	95,00	57	96,61	26	100,00	0,526
		> 200	2	5,00	2	3,39	0	0,00	
Ceruloplasmina	mg/dL	≤ 58	33	97,06	51	98,08	20	100,00	0,745
		> 58	1	2,94	1	1,92	0	0,00	
Glicémia	mg/dL	≤ 110	32	86,49	50	89,29	19	90,48	0,877
		> 110	5	13,51	6	10,71	2	9,52	
Insulina	mU/mL	≤ 25	29	87,88	48	87,27	18	85,71	0,973
		> 25	4	12,12	7	12,73	3	14,29	
Homa	mU/mL.mg/dL	≤ 2	28	93,33	47	94,00	17	94,44	0,987
		> 2	2	6,67	3	6,00	1	5,56	
Péptido C	ng/mL	≤ 3,9	31	91,18	51	94,44	18	85,71	0,463
		> 3,9	3	8,82	3	5,56	3	14,29	

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson

Tabela 4.23. - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis categóricas) estudados com os genótipos (AA ou GA *versus* GG) do polimorfismo AGT AT-6G/A na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	Valores Referência	AGT AT-6G/A				p*	Odds Ratio	IC 95%
			AA ou GA (N)	%	GG (N)	%			
Sexo		Masculino	46	54,12%	21	52,50%	0,866	-	-
		Feminino	39	45,88%	19	47,50%			
IMC	Kg/m ²	< 25	43	58,90%	13	40,63%	0,084	-	-
		≥ 25	30	41,10%	19	59,38%			
RNA	UI/mL	< 400000	21	26,92%	9	25,00%	0,828	-	-
		≥ 400000	57	73,08%	27	75,00%			
		< 600000	25	32,05%	11	30,56%	0,873	-	-
		≥ 600000	53	67,95%	25	69,44%			
Plaquetas	U/mm ³	< 150000	19	24,36%	9	24,32%	0,997	-	-
		≥ 150000	59	75,64%	28	75,68%			
Fosfatase Alcalina	UI/mL	≤ 129	74	96,10%	32	86,49%	0,060	-	-
		> 129	3	3,90%	5	13,51%			
AST	UL/mL	≤ 34	19	24,36%	8	21,05%	0,692	-	-
		> 34	59	75,64%	30	78,95%			
ALT	UL/mL	≤ 49	33	42,31%	14	36,84%	0,574	-	-
		> 49	45	57,69%	24	63,16%			
GAMA GT	UL/mL	≤ 37	22	28,21%	13	34,21%	0,508	-	-
		> 37	56	71,79%	25	65,79%			
Colesterol total	mmol/L	< 4,92	57	74,03%	24	66,67%	0,419	-	-
		≥ 4,92	20	25,97%	12	33,33%			
HDL	mmol/L	≤ 1,04	66	88,00%	31	86,11%	0,779	-	-
		> 1,04	9	12,00%	5	13,89%			
LDL	mmol/L	< 2,8	53	72,60%	23	65,71%	0,463	-	-
		≥ 2,8	20	27,40%	12	34,29%			
Triglicéridos	mmol/L	< 1,69	67	85,90%	34	94,44%	0,182	-	-
		≥ 1,69	11	14,10%	2	5,56%			
APOA1	g/L	≤ 205	80	94,12%	36	90,00%	0,406	-	-
		> 205	5	5,88%	4	10,00%			
Ferro	mg/dL	≤ 175	64	85,33%	31	83,78%	0,830	-	-
		> 175	11	14,67%	6	16,22%			
Ferritina	mg/dL	≤ 332	54	72,00%	29	78,38%	0,469	-	-
		> 332	21	28,00%	8	21,62%			
Saturação da Transferrina	%	≤ 40	46	59,74%	20	52,63%	0,468	-	-
		> 40	31	40,26%	18	47,37%			
Transferrina	mg/dL	≤ 450	70	98,59%	35	97,22%	0,621	-	-
		> 450	1	1,41%	1	2,78%			
Haptoglobina	mg/dL	≤ 200	83	97,65%	38	95,00%	0,433	-	-
		> 200	2	2,35%	2	5,00%			
Ceruloplasmina	mg/dL	≤ 58	71	98,61%	33	97,06%	0,584	-	-
		> 58	1	1,39%	1	2,94%			
Glicemia	mg/dL	≤ 110	69	89,61%	32	86,49%	0,623	-	-
		> 110	8	10,39%	5	13,51%			
Insulina	mU/mL	≤ 25	66	86,84%	29	87,88%	0,882	-	-
		> 25	10	13,16%	4	12,12%			
Homa	mU/mL.mg/dL	≤ 2	64	94,12%	28	93,33%	0,881	-	-
		> 2	4	5,88%	2	6,67%			
Péptido C	ng/mL	≤ 3,9	69	92,00%	31	91,18%	0,885	-	-
		> 3,9	6	8,00%	3	8,82%			

* Teste de independência do qui-quadrado de Pearson

Agrupando os indivíduos portadores do alelo mutante (AA e GA), não se observam diferenças significativas para nenhum dos parâmetros.

Realizou-se uma análise de variância simples (One-way ANOVA), para apurar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) para cada genótipo do polimorfismo AGT AT-6G/A (Tabela 4.24.).

Tabela 4.24. - Avaliação dos valores médios dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (contínuas) nos diferentes genótipos do polimorfismo AGT AT-6G/A na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	AGT AT-6G/A	N	Média	Desvio Padrão	ρ^*
Idade	Anos	GG	37	55,97	13,58	0,338
		GA	56	52,55	11,68	
		AA	21	55,57	8,45	
IMC	Kg/m ²	GG	32	26,02	4,09	0,034
		GA	54	24,30	3,86	
		AA	19	29,63	15,86	
RNA	UI/mL	GG	36	1,93E+06	2,60E+06	0,713
		GA	57	2,54E+06	4,87E+06	
		AA	21	1,98E+06	2,16E+06	
Plaquetas	U/mm ³	GG	36	1,93E+05	6,90E+04	0,680
		GA	57	2,04E+05	7,84E+04	
		AA	21	2,11E+05	8,09E+04	
Fosfatase Alcalina	UI/mL	GG	37	85,32	47,48	0,496
		GA	56	76,84	26,41	
		AA	21	78,24	24,50	
AST	UI/mL	GG	37	63,78	38,72	0,181
		GA	57	51,44	21,75	
		AA	21	56,57	38,56	
ALT	UI/mL	GG	37	82,51	63,90	0,359
		GA	57	67,28	38,58	
		AA	21	72,19	51,28	
GAMA GT	UI/mL	GG	37	94,59	104,60	0,384
		GA	57	71,11	66,10	
		AA	21	92,38	105,49	
Colesterol total	mmol/L	GG	36	4,41	0,90	0,502
		GA	56	4,27	0,80	
		AA	21	4,54	1,22	
HDL	mmol/L	GG	36	1,52	0,55	0,345
		GA	54	1,66	0,72	
		AA	21	1,45	0,44	
LDL	mmol/L	GG	35	2,49	0,72	0,112
		GA	52	2,28	0,83	
		AA	21	2,71	0,87	
Triglicéridos	mmol/L	GG	36	1,10	0,43	0,539
		GA	57	1,22	0,73	
		AA	21	1,08	0,47	
APOA1	g/L	GG	34	5,05	19,96	0,780
		GA	53	4,83	23,41	
		AA	21	1,50	0,23	
Ferro	mg/dL	GG	37	125,08	57,47	0,911
		GA	55	128,48	40,98	
		AA	20	123,98	43,10	
Ferritina	mg/dL	GG	37	240,84	199,69	0,731
		GA	55	270,49	217,90	
		AA	20	239,08	154,18	
Saturação da Transferrina	%	GG	38	39,29	19,76	0,851
		GA	55	38,78	13,05	
		AA	22	37,00	11,65	
Transferrina	mg/dL	GG	36	328,62	59,51	0,153
		GA	51	328,84	58,36	
		AA	20	300,61	54,49	

Haptoglobina	mg/dL	GG	33	100,79	54,15	0,907
		GA	51	101,81	45,66	
		AA	21	96,48	36,29	
Ceruloplasmina	mg/dL	GG	34	36,62	11,76	0,826
		GA	52	35,60	11,37	
		AA	20	37,35	11,53	
Glicemia	mg/dL	GG	37	103,35	42,20	0,212
		GA	56	93,46	30,24	
		AA	21	89,24	11,40	
Insulina	mU/mL	GG	33	15,39	12,24	0,867
		GA	55	17,64	27,22	
		AA	21	15,47	16,28	
Homa	mU/mL.mg/dL	GG	30	0,42	1,54	0,784
		GA	50	0,64	2,65	
		AA	18	0,26	0,74	
Péptido C	ng/mL	GG	34	2,24	1,56	0,682
		GA	54	2,42	2,18	
		AA	21	2,73	2,31	
Atividade ECA	U/L	GG	13	21,48	7,21	0,434
		GA	22	18,95	5,24	
		AA	14	18,81	6,38	

* One-way ANOVA

Registaram-se valores estatisticamente significativos para o parâmetro bioquímico IMC.

4.7. Correlação de Pearson entre parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos

Na Tabela 4.25. pode ser observada as correlações existentes e estatisticamente significativas entre as variáveis contínuas estudadas na população com HCC.

Tabela 4.25. – Correlação de Pearson entre parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) para a população com HCC.

População com HCC				
Idade	AST	Péptido C		
	(r= 0,238; p= 0,011)	(r= 0,287; p= 0,003)		
IMC	GAMA GT			
	(r= 0,505; p= 0,000)			
RNA	GAMA GT	Haptoglobina		
	(r= 0,356; p= 0,000)	(r= 0,209; p= 0,033)		
Plaquetas	AST	ALT	Colesterol total	Ferro
	(r= -0,409; p= 0,000)	(r= -0,304; p= 0,001)	(r= 0,186; p= 0,050)	(r= -0,238; p= 0,012)

Fosfatase Alcalina	AST (r= 0,438; p= 0,000)	ALT (r= 0,394; p= 0,000)	GAMA GT (r= 0,417; p= 0,000)	Glicémia (r= 0,371; p= 0,000)
AST	ALT (r= 0,752; p= 0,000)	GAMA GT (r= 0,413; p= 0,000)	Transferrina (r= 0,239; p= 0,013)	Glicémia (r= 0,239; p= 0,010)
ALT	GAMA GT (r= 0,378; p= 0,000)	HDL (r= -0,219; p= 0,021)	Ferritina (r= 0,252; p= 0,007)	Glicémia (r= 0,413; p= 0,000)
GAMA GT	Glicémia (r= 0,211; p= 0,024)	Homa (r= 0,253; p= 0,012)		
Colesterol total	Fosfatase Alcalina (r= -0,205; p= 0,030)	AST (r= -0,298; p= 0,001)	HDL (r= 0,227; p= 0,017)	LDL (r= 0,701; p= 0,000)
HDL	AST (r= -0,195; p= 0,040)	Péptido C (r= -0,277; p= 0,004)		
LDL	Glicémia (r= 0,204; p= 0,035)			
Triglicéridos	Transferrina (r= 0,293; p= 0,002)	Insulina (r= 0,296; p= 0,002)	Péptido C (r= 0,349; p= 0,000)	
APOA1	Homa (r= 0,479; p= 0,000)	Péptido C (r= 0,231; p= 0,017)		
Ferro	Ferritina (r= 0,452; p= 0,000)	Saturação da Transferrina (r=0,917 ; p=0,000)	Haptoglobina (r= -0,298; p= 0,002)	Ceruloplasmina (r= -0,260; p= 0,008)
Ferritina	Plaquetas (r= -0,193; p= 0,042)	Ceruloplasmina (r= -0,230; p= 0,019)	Saturação da Transferrina (r=0,474; p=0,000)	
Saturação da Transferrina	Transferrina (r=-0,404; p=0,000)	Haptoglobina (r=-0,238;p=0,017)	Ceruloplasmina (r=-0,295; p=0,003)	
Haptoglobina	Plaquetas (r= 0,394; p= 0,000)	AST (r= -0,216; p= 0,027)	Ceruloplasmina (r= 0,229; p= 0,020)	
Ceruloplasmina	Fosfatase Alcalina (r= 0,286; p= 0,003)	Homa (r= -0,225; p= 0,035)		
Insulina	Homa (r= 0,248; p= 0,016)	Péptido C (r= 0,209; p= 0,030)		

* Tabela completa em Anexo (Tabela Suplementar – 8.6.)

5. Discussão

A infecção pelo VHC constitui um grande problema de saúde a nível global.

Após exposição aguda ao VHC, cerca de 55% a 85% dos doentes desenvolvem hepatite C crónica. O desenvolvimento de fibrose ou cirrose é a consequência mais significativa da infecção por este vírus.

A progressão de fibrose varia substancialmente entre indivíduos e é influenciada por um conjunto de fatores. A capacidade de prever o risco individual para a progressão da doença tem implicações importantes ao nível do diagnóstico e em termos terapêuticos.

Estudos epidemiológicos em humanos examinam a relação entre vários polimorfismos genéticos e o grau de fibrose em pacientes com doença hepática crónica.

5.1. Relação de parâmetros bioquímicos com a infeção crónica pelo VHC e o grau de fibrose hepática

Hsu et al. num estudo de caso-controlo para o perfil metabólico de pacientes com HCC verificaram que o VHC está associado a baixos níveis de LDL, colesterol, triglicéridos e altos níveis de HDL e ALT ^[91].

Fathy et al. observam o mesmo para o ALT e acrescenta uma associação do VHC com altos níveis de AST e fosfatase alcalina ^[174].

Um dos objetivos secundários deste estudo era estudar a influência dos parâmetros bioquímicos na progressão da doença hepática.

Para a deteção de níveis significantes de fibrose, Saludes et al. referem diversos testes à base de soro, combinando marcadores diretos e/ou indiretos de fibrose como propostas alternativas às biópsias hepáticas ^[50]. Alguns dos parâmetros considerados, usados nestes testes, coincidem com os deste estudo, nomeadamente AST, plaquetas, ALT, GGT, colesterol, idade, género, haptoglobina, APOA1. Deste modo, espera-se que estes parâmetros tenham uma relação com o grau de fibrose. Contudo, no presente estudo tal não se verifica para alguns deles, como o colesterol, idade, género, APOA1.

Obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos parâmetros plaquetas, fosfatase alcalina, AST, ALT, GGT, ferro, ferritina e glicémia, para os diferentes graus de fibrose (Tabela 4.12. e 4.13.).

Plaquetas

Os indivíduos com um valor de plaquetas inferior ao valor de referência (<150000) poderão estar associados a um desenvolvimento de um maior grau de fibrose F3/4 (fibrose intensa ou cirrose) comparativamente com os indivíduos cujos valores se encontram dentro do valor de referência (≥ 150000). Tal está de acordo com os estudos de Lima et al. e Esmat et al. ^[175,176].

Segundo Fusegawa et al. este fenómeno verifica-se uma vez que a trombocitopenia (redução do número de plaquetas no sangue) é uma complicação comum das hepatopatias crónicas em estádios avançados ^[177]. A maioria dos casos de trombocitopenia, no contexto de doença hepática, está associada com uma condição denominada por hiperesplenismo ^[178]. Quando existe um processo inflamatório como é o caso da hepatite C, as plaquetas são muitas vezes consumidas pelo baço. O baço é um órgão repleto de vasos sanguíneos, pois é responsável pela produção, armazenamento, controlo e destruição de células sanguíneas. Com o aumento da resistência à passagem do sangue através do fígado (fibrose), aumenta a pressão sanguínea dentro do sistema portal hepático (hipertensão portal). O aumento na pressão da veia esplénica faz com que o baço aumente. Deste modo, o baço captura e destrói a um ritmo acelerado vários tipos de células sanguíneas ^[179].

As plaquetas auxiliam no recrutamento de leucócitos e células progenitoras para os locais de lesão vascular e de inflamação. Induzem alterações na permeabilidade celular e promovem quimiotaxia e proliferação celular, etapas essenciais na reparação dos tecidos celulares ^[180]. A função das plaquetas na regeneração hepática parece ser mediada pela serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT). Estas são libertadas em locais de lesão tecidular como parte da sua ação na homeostasia celular ^[181]. A 5-HT estimula tanto a vasoconstrição como a vasodilatação, influencia as respostas inflamatórias e promove a formação de uma cicatriz temporária que atua como um suporte para o tecido normal a ser restaurado. No entanto, em situações de lesão crónica a sinalização da 5-HT pode ter efeitos deletérios e promover uma cicatrização anormal das feridas, levando ao desenvolvimento de fibrose tecidular e alteração na regeneração dos órgãos ^[182].

O TGF- β desempenha um papel central na cicatrização de feridas e na reparação dos tecidos celulares. É produzido por vários tipos de células parenquimatosas, e também é produzido ou libertado por células infiltrantes, como linfócitos, monócitos/macrófagos e plaquetas. Após lesão ou inflamação, todas estas células são fontes potenciais de TGF- β . Em geral, a libertação e ativação do TGF- β estimula a produção de várias proteínas da matriz extracelular e inibe a degradação dessas proteínas nessa matriz ^[183]. Estas ações do TGF- β contribuem para a reparação tecidular, que, sob circunstâncias ideais, leva à restauração da arquitetura tecidular normal. Contudo, em muitas doenças, o excesso de TGF- β contribui para um excesso patológico de fibrose tecidular comprometendo a função normal do órgão ^[183].

Marcadores Hepáticos

Em concordância com os resultados deste estudo, Koda et al. verificaram uma relação estatisticamente significativa entre elevados valores de fosfatase alcalina e um elevado grau de fibrose ^[184].

Para elevados níveis de AST registaram-se maiores possibilidades de os doentes possuírem um grau de fibrose F3/4 em relação a outros que apresentem níveis mais baixos. Tal está de acordo com o estudo de Guyader et al. e Vagu et al. ^[129,185].

Guyader et al. e Vagu et al. também verificam a mesma conclusão para o parâmetro do ALT ^[129,185]. O mesmo está em concordância com os resultados deste estudo.

Estas enzimas (ALT e AST), são maioritariamente encontradas nos hepatócitos do fígado. São uma das principais ferramentas de diagnóstico de doenças hepáticas, uma vez que, a lesão nos hepatócitos provoca uma libertação mais elevada destas enzimas para a corrente sanguínea ^[186]. Isto poderá explicar o motivo pelo qual os doentes com HCC deste estudo, registarem níveis mais elevados de AST e ALT para níveis de fibrose mais elevados.

Relativamente ao parâmetro GGT os doentes que apresentam níveis elevados neste parâmetro, poderão ter uma maior suscetibilidade de desenvolver F3/4. Após revisão da literatura verifica-se que estes resultados estão de acordo com o estudo de Lima et al. e Koda et al. ^[175,184].

Durante o processo de fibrogénese hepática o aumento dos níveis de GGT na fibrose hepática está associado ao fator de crescimento do hepatócito (aumentado em pacientes com doenças hepáticas) e é estimulado por um aumento do fator de crescimento epidérmico ^[187-189].

Metabolismo Lípidico

Não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes na distribuição dos parâmetros do perfil lipídico. Porém, registou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o valor médio de LDL para diferentes níveis de fibrose. Observou-se um valor médio mais baixo para o grau de fibrose F3/4, comparativamente com o valor médio para o grau de F1/2 (Tabela 4.13.).

Não se encontraram dados que relacionassem parâmetros lípidos com a progressão da fibrose hepática na população com HCC. No entanto Ghadir et al., num estudo para doentes com cirrose, verificaram que estes apresentam níveis mais baixos de lípidos (HDL, LDL, colesterol total e triglicéridos), comparativamente com um grupo saudável ^[190].

O fígado desempenha um papel vital no metabolismo lipídico e é o principal local de formação e eliminação de lipoproteínas. Deste modo, aquando de doenças hepáticas severas o metabolismo lipídico é desregulado ^[191].

A infeção do VHC está clinicamente associada com alterações significativas nos níveis séricos das lipoproteínas (principalmente HDL e LDL), comparativamente com o perfil lípido de indivíduos saudáveis, como demonstrado no estudo de Nogueira et al. ^[191].

As condições inflamatórias são frequentemente associadas a mudanças significativas no metabolismo sistêmico do ferro. Uma das consequências importantes desta alteração metabólica é a diminuição dos níveis plasmáticos de ferro. O principal fator responsável por esta alteração do metabolismo do ferro é o aumento da expressão da hepcidina, que controla a absorção de ferro intestinal e a liberação de ferro dos macrófagos ^[192,193]. A interrupção da regulação da hepcidina tem sido postulada como um possível mecanismo de sobrecarga de ferro, em condições adquiridas onde se inclui a HCC ^[194].

Para os parâmetros ferro e ferritina observa-se que valores mais elevados destes parâmetros geralmente se encontram associados a um nível mais elevado de fibrose hepática. Os estudos de Guyader et al. e Vagu et al. corroboram esta afirmação ^[129,185].

Alguns estudos sugerem que elevados níveis de ferro podem agravar a atividade hepática necroinflamatória na HCC assim como acelerar a progressão da fibrose hepática e que podem desempenhar um papel crítico no desenvolvimento de CHC ^[131,195].

Segundo Vagu et al. isto pode dever-se aos danos provocados nos hepatócitos que levam à liberação de ferro e ferritina, o que poderá explicar os elevados níveis de ferro e ferritina verificados nos doentes com F3/F4. Este processo também pode contribuir para os elevados níveis de ALT nestes doentes.

Constatam-se ainda diferenças estatisticamente significativas nos valores médios de transferrina e haptoglobina por grau de fibrose. Nota-se que para graus de fibrose mais elevados os valores médios de transferrina são também mais elevados, enquanto que para os valores médios de haptoglobina se verifica o oposto (Tabela 4.13.).

Lebray et al. e Guyader et al. registam a mesma associação entre os valores médios de transferrina e o grau de fibrose ^[129,196]. O aumento dos níveis de transferrina está geralmente associado ao aumento dos níveis de ferro no fígado ^[197].

Contrariamente a estes resultados Vagu et al. não observa qualquer relação entre o grau de fibrose na população com HCC e a transferrina.

Relativamente à haptoglobina os resultados observados estão de acordo com o estudo de Grigorescu et al., que regista uma associação forte e negativa com a fibrose hepática ^[187].

Os resultados observados podem ser explicados pelo aumento do fator de crescimento do hepatócito que estimula o declínio da síntese da haptoglobina ^[187].

Arain et al. não verifica qualquer relação deste parâmetro com o grau de fibrose ^[198].

Foi observada uma associação estatisticamente expressiva entre valores mais elevados de glicémia e graus de fibrose F3/4. Tal está de acordo com o estudo de Guyader et al.

A RI, tolerância à glucose diminuída e diabetes tipo II são manifestações extra-hepáticas frequentes do VHC [199].

O VHC atua por múltiplas vias metabólicas causando diminuição metabólica da glucose e RI. Assim a infecção do VHC aumenta a expressão gluconeogénica dos genes (Glucose-6-fosfatase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase 2), o que leva à hiperglicemia e RI [200].

A MEC é uma estrutura dinâmica que se reestrutura durante períodos de lesão e reparo. A fibrose pode estar associada à remodelação da MEC e contribuir deste modo para mudanças na ação da insulina. Pacientes com cirrose e hepatite crónica apresentam uma diminuição da extração hepática de insulina, em comparação com indivíduos normais. Essa diminuição na purificação de insulina pode ser atribuída aos danos no fígado ou a desvios da circulação portal sistémica. Uma extensão disso é a redução da ação da insulina e eventualmente a resistência à insulina. O remodelamento da MEC gera, portanto, uma barreira mecânica que impede o transporte de glucose e insulina para o fígado [97].

Correlação de Pearson entre parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos

- Relação dos parâmetros bioquímicos alterados na fibrose hepática e as enzimas hepáticas

Relativamente às correlações encontradas, verifica-se que as plaquetas e a haptoglobina apresentam uma correlação inversa com as enzimas hepáticas (Figura 5.1.). Está de acordo com o esperado, uma vez que, eram parâmetros que estavam diminuídos para graus de fibrose mais elevados (F3/4). No que diz respeito aos outros parâmetros, estes apresentam uma correlação direta com as enzimas hepáticas, tal como se previa, uma vez que, estes parâmetros estavam aumentados para graus de fibrose mais elevados (F3/4). A correlação do ferro e da LDL com as enzimas hepáticas estabelece-se por intermédio de outros parâmetros (ferritina e glicémia).

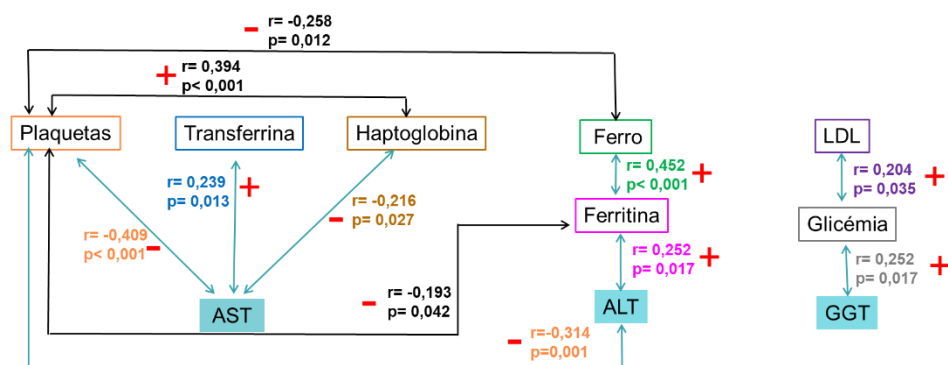


Figura 5.1. – Correlação dos parâmetros bioquímicos alterados na fibrose hepática e enzimas hepáticas.

- Relação dos parâmetros bioquímicos condicionados pelo genótipo e enzimas hepáticas

Denota-se uma correlação direta entre o IMC e a GGT e uma correlação indireta entre a HDL e a AST (Figura 5.2.).

Os indivíduos portadores de determinados genótipos, de alguns dos genes estudados, poderão ter uma maior predisposição para o desenvolvimento de síndrome metabólica e, conseqüentemente, para doença hepática mais grave, o que pode acabar por se traduzir num aumento das enzimas hepáticas (marcadores de lesão hepática).

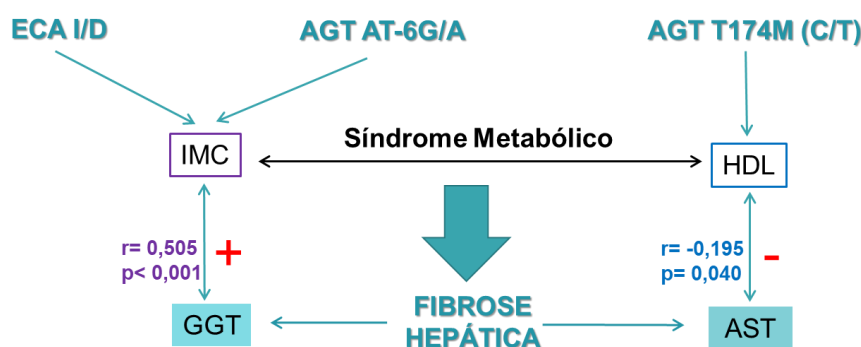


Figura 5.2. – Correlação dos parâmetros bioquímicos condicionados pelo genótipo e enzimas hepáticas.

5.2. Suscetibilidade Genética para a HCC para a progressão da doença hepática

As distribuições genótípicas dos polimorfismos I/D do gene ECA, A1166C do gene AGTR1 e T174M e A-6G do gene AGT na população de controlo, estão de acordo com o princípio de Hardy-Weinberg.

5.2.1. Polimorfismo I/D do gene da ECA

As frequências alélicas I/D do gene ECA observadas na população HCC estudada: 8,8% II, 44,0% ID e 47,2% DD, regista um maior número de indivíduos com o genótipo DD comparativamente com a distribuição do grupo de controlo saudável. Contudo, esta diferença não é estatisticamente significativa (Tabela 4.5.). A distribuição observada está de acordo com as distribuições observadas nos grupos de controlo dos estudos de Raslan et al. e Amr et al. [201,202]. No entanto ambos os estudos, contrariamente ao nosso, registam uma diferença estatisticamente significativa entre os doentes com HCC e o grupo de controlo, observando-se um aumento da frequência do genótipo DD entre doentes. Deste modo, mais estudos que comprovem que o genótipo DD aumenta a suscetibilidade genética para a cronicidade pelo vírus da Hepatite C, são necessários.

Também não foram observadas relações significativas entre a distribuição genotípica do gene ECA e o grau de fibrose da população doente estudada (Tabela 4.10. e 4.11.). Tal vai de encontro ao registado nos estudos de Raslan et al., Amr et al., Forrest et al. e Turhan et al. [112,201,202, 203].

5.2.2. Polimorfismo A1166C do gene AGTR1

A distribuição alélica do polimorfismo A1166C do gene AGTR1 registadas na população com HCC estudada, não apresenta diferenças estatisticamente significativas da população de controlo saudável (Tabela 4.6.). A distribuição observada 53,6% AA, 42,4% AC e 4,0% CC é semelhante ao grupo de controlo saudável, de um estudo de Pei et al., que teve por base uma população caucasiana, no entanto difere das distribuições alélicas verificadas em populações asiáticas onde o genótipo AA representa mais de 80% [204-206].

Não foram verificadas relações significativas entre a distribuição genotípica do polimorfismo A1166C e o grau de fibrose da população com HCC (Tabela 4.10. e 4.11.). Este resultado apoia o estudo de Forrest et al. [112]. Este polimorfismo aparenta não estar relacionada com a progressão da fibrose. Na literatura, este polimorfismo é principalmente associado à suscetibilidade para a hipertensão arterial idiopática.

5.2.3. Polimorfismo T174M do gene AGT

O polimorfismo T174M do gene AGT apresenta uma distribuição genotípica, de acordo com a observada na população caucasiana (CEU) do *Hapmap Project* e com um estudo japonês de Ono et al. [207]. No presente estudo, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas do polimorfismo T174M na população com HCC estudada e o grupo de controlo (Tabela 4.7.).

Não foram observadas diferenças significativas na distribuição genotípica do polimorfismo T174M para diferentes graus de fibrose (Tabela 4.10. e 4.11.). Este polimorfismo aparenta não estar assim relacionado com a progressão da fibrose hepática na população com HCC. Não foram encontrados estudos que suportassem ou contrariassem estes resultados. No entanto, o estudo de Ono et al. estuda a possível associação entre este polimorfismo e a população japonesa com esteato-hepatite não alcoólica, não se verificando qualquer relação entre eles [207].

5.2.4. Polimorfismo AT-6G/A do gene AGT

Relativamente ao polimorfismo AT-6G/A do gene AGT, não foram observadas diferenças estatisticamente consideráveis entre as frequências alélicas observadas na população com HCC estudada e o grupo de controlo (Tabela 4.8.). Estas distribuições estão de acordo com as distribuições observadas nos estudos de Forrest et al., Powell et al. e Molina et al. [112, 155, 208]. Após revisão da literatura, não foram encontrados estudos que comparassem as frequências do polimorfismo AT-6G/A do gene AGT entre pacientes com HCC e controlos saudáveis. Molina et al. compara as frequências deste polimorfismo com controlos saudáveis para o grau de fibrose pulmonar, não se observando qualquer relação [155].

Neste estudo não foram também observadas relações significativas entre a distribuição genotípica do polimorfismo AT-6G/A e o grau de fibrose da população com HCC estudada (Tabela 4.10. e 4.11.). Tal vai de encontro ao verificado no estudo de Forrest et al., contrariando o verificado pelo estudo de Powell et al. que constata que indivíduos com o genótipo AA seriam mais suscetíveis a apresentar maiores níveis de fibrose comparativamente aos outros ^[112,208].

5.3. Relação dos parâmetros bioquímicos com os polimorfismos genéticos estudados

Outro dos objetivos secundários, consistia em determinar a relação dos parâmetros bioquímicos estudados com os polimorfismos genéticos na população com HCC, com especial enfoque na relação do polimorfismo I/D do gene ECA com os níveis de soro da ECA.

Polimorfismo I/D do gene da ECA

Como referido anteriormente não foram observadas relações significativas entre a distribuição genotípica do gene ECA, a HCC e o grau de fibrose dos doentes com VHC.

Entre o polimorfismo ECA e os parâmetros bioquímicos estudados não foi verificada nenhuma relação de dependência significativa (Tabela 4.14.). Contudo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os valores médios dos parâmetros IMC e atividade da ECA por genótipo do polimorfismo I/D do gene ECA (Tabela 4.15.). No parâmetro IMC verificou-se um valor médio superior quando o doente apresentava o genótipo II, comparativamente com o genótipo ID e DD. Verifica-se uma relação da atividade da ECA com a presença de HCC, ou seja, com este trabalho mostra-se que os indivíduos que apresentam esta doença têm uma maior atividade desta enzima, em comparação com os indivíduos que a não apresentam. A HCC é acompanhada de uma inflamação crónica, que leva posteriormente à ativação de sistemas de fase aguda como é o caso do SRA e consequentemente promove um aumento da atividade da ECA. No que concerne ainda este parâmetro, observa-se que os doentes com o genótipo DD apresentam um valor médio mais elevado, os doentes com o genótipo II um valor médio mais baixo, enquanto que os doentes com o genótipo ID apresentavam um valor médio intermédio.

Mackawy et al. e Turhan et al. observaram em doentes com o VHC a mesma relação entre a atividade da ECA e os seus genótipos, tendo-se registado que na presença do alelo D a atividade da ECA apresenta valores superiores ^[203,209].

Diversos estudos para investigar a relação do polimorfismo I/D do gene ECA e/ou os níveis de ECA sérico com a fibrose hepática e o VHC têm chegado a distintas conclusões (Tabela 5.1.). Os efeitos do polimorfismo do gene ECA na fibrogénese foi já investigado em diferentes doenças hepáticas, sem que se tenha chegado ainda a um consenso ^[210].

Tabela 5.1. - Estudos que investigam o polimorfismo I/D do gene ECA e/ou os níveis de ECA sérico associados com a fibrose hepática, em populações com HCC.

Autores	Observações
Powell et al. (2000)	Não se verifica uma relação significativa entre o polimorfismo I/D do gene ECA e o grau de fibrose.
Forrest et al. (2005)	Não se verifica uma relação significativa entre o polimorfismo I/D do gene ECA e o grau de fibrose.
Fabris et al. (2009)	Nas mulheres, observou-se que o genótipo II apresenta maior níveis de fibrose.
Raslan et al. (2011)	Apesar do genótipo DD ser mais comum entre os pacientes HCC, não se verificou uma relação significativa entre o polimorfismo I/D do gene ECA e o grau de fibrose.
Mackawy et al. (2012)	Os níveis da atividade da ECA em pacientes com HCC com o genótipo DD era superior aos pacientes com os genótipos ID e II.
Purnak et al. (2012)	Os níveis da atividade da ECA em pacientes HCC com níveis avançados de fibrose, demonstrou ser superior aos pacientes com níveis moderados de fibrose.
Yuan et al. (2013)	Verificou-se uma associação significativa entre o genótipo DD e uma menor suscetibilidade para a HCC.
Zha et al. (2014)	As frequências do alelo D do gene ECA em doentes com HCC foram superiores às dos controlos.
Hamamcioğlu et al. (2015)	Os níveis da atividade da ECA em pacientes com HCC com o alelo D era superior aos pacientes com o alelo I.

Adaptado de Turhan et al. (2015) ^[203]

Elsammak et al. num estudo semelhante, para alguns destes parâmetros por genótipo do gene ECA numa população com o VHC, contraria os nossos resultados, denotando diferenças estatisticamente significativas para a glicémia, GGT, ALT. Relativamente aos parâmetros fosfatase alcalina, AST, plaquetas, à semelhança do nosso estudo não observa qualquer relação com o polimorfismo ECA ^[211].

Num outro estudo, Fathy et al. não observa qualquer relação entre os parâmetros ALT, AST e fosfatase alcalina e os diferentes genótipos do gene ECA, numa população com HCC ^[174].

Para os restantes parâmetros, não foi possível encontrar na literatura disponível, estudos que estudem a sua associação com os diferentes genótipos do gene ECA, numa população com HCC.

Polimorfismo A1166C do gene AGTR1

Relativamente ao polimorfismo A1166C do gene AGTR1 com os parâmetros bioquímicos estudados, não se observaram relações de dependência, estatisticamente consideráveis.

Polimorfismo T174M do gene AGT

No polimorfismo AGT T174M, observou-se uma relação de dependência entre os parâmetros IMC e HDL e os seus genótipos.

Nota-se que um doente com o VHC e o genótipo CC apresenta maiores possibilidades de ter maiores valores de IMC, do que os doentes com o genótipo TT ou CT.

Relativamente ao parâmetro HDL, há uma maior probabilidade de os doentes com o genótipo TT ou CT, apresentarem valores inferiores deste parâmetro relativamente aos doentes com o genótipo CC.

Observa-se ainda uma diferença estatisticamente significativa no valor médio de transferrina para cada genótipo. Os doentes com VHC, com o genótipo CT apresentam um valor médio de transferrina superior aos doentes com os outros genótipos.

Polimorfismo AT-6G/A do gene AGT

Para o polimorfismo AGT AT-6G/A verificou-se uma diferença considerável em termos estatísticos entre os valores médios de IMC nos diferentes genótipos do gene AGT. Os doentes com o genótipo AA apresentam valores deste parâmetro superiores aos doentes com outros genótipos deste polimorfismo.

6. Conclusão

Nos últimos anos a ciência tem experimentado grandes avanços no estudo da genética do ser humano. Estes estudos têm como um dos seus principais objetivos identificar genes com variações específicas nas sequências de DNA que aumentem ou diminuam a suscetibilidade à doença. Grande parte do sucesso destes estudos depende da arquitetura genética da doença, ou seja:

- Número de variantes genéticas que afetam a suscetibilidade à doença;
- Distribuição de alelos e genótipos nesses genes e a sua relação funcional com os processos envolvidos (biomarcadores substitutos);
- Forma como os alelos e os genótipos podem contribuir para a suscetibilidade à doença.

Na última década, o papel do potencial do SRA como um sistema de fase aguda na patogénese da fibrose hepática tem sido explorado extensivamente.

Neste estudo procurou-se estudar quatro polimorfismos genéticos (um do gene da ECA - I/D, um do gene do AT1 - A1166C e dois do gene AGT - T174M e AT-6 G/A) deste sistema e perceber qual a sua influência na progressão da doença hepática numa população com HCC.

Não se encontraram relações de associação entre os polimorfismos estudados e a sua influência na suscetibilidade para se contrair HCC e a progressão da doença hepática, isto é, com os fenótipos distantes. É importante ter em conta que a etiologia da fibrose hepática é multifatorial e conta com a influência de fatores do vírus, do hospedeiro e do ambiente. Apesar da obtenção destes resultados não se deve minorar a importância do SRA na fibrose hepática, porque podem influenciar a suscetibilidade para comorbidades associadas como a obesidade e a síndrome metabólica.

Identificaram-se, no entanto, alguns marcadores intermediários, validados noutros estudos, que se podem relacionar com o desenvolvimento e progressão desta patogénese - plaquetas, fosfatase alcalina, AST, ALT, GGT, ferro, ferritina e glicémia. Verificou-se de igual modo que a atividade da ECA se pode relacionar com desenvolvimento e a progressão desta patogénese. Uma maior actividade da ECA na fibrose hepática, pode contribuir para a morbilidade dos doentes nesta situação. Os indivíduos portadores do genótipo DD poderão apresentar um maior risco de desenvolver doença hepática mais grave.

Para confirmar as associações encontradas será necessário estudar uma amostra populacional com mais indivíduos e uma abrangência geográfica mais ampla. Poderá ajudar a dissipar dúvidas que ainda permanecem e geram controvérsia entre investigadores.

Como análises futuras propõem-se o estudo de haplótipos do gene AGT e de relações epistáticas entre os vários polimorfismos do SRA.

7. Bibliografia

- [1] - Centers for Disease Control and Prevention. (2018). *Viral Hepatitis*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hepatitis/abc/index.htm>.
- [2] - Duffy D., Mamdouh R., Laird M., Sonesson C., Foulter L., El-Daly M., et al. "The ABCs of Viral Hepatitis That Define Biomarker Signatures of Acute Viral Hepatitis". *Hepatology*. (2014); Vol. 59 (4); 1273-1282.
- [3] Trepo C. "A brief history of hepatitis milestones". *Liver International*. (2014); Vol.34 (1); 29-37.
- [4] Tilak A., Thakur R. N., Gangwar S. S., Sharma R. "Protect Your Liver from Hepatitis". *Innovat International Journal Of Medical & Pharmaceutical Sciences*. (2018); Vol. 3 (1); 7-10.
- [5] <http://www.worldhepatitisalliance.org/what-viral-hepatitis-0>
- [6] Saha S., Sikdar P., Lavanya D., Babu M. N. "An Overview on Hepatitis and its Prevention". *International Journal of Pharma And Chemical Research*. (2016). Vol.2 (4); 210-219.
- [7] - Pawlotsky J. M., Feld J. J., Zeuzem S., Hoofnagle J. H. "From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure". *Journal of Hepatology*. (2015); Vol. 62 (1); 87-99.
- [8] - Holland P. V., Alter H. J. "Non-A, non-B viral hepatitis". *Human Pathology*. (1981); Vol. 12 (12); 1114-1122.
- [9] – Alter H. J. "The case against transfusion-transmitted non-ABC hepatitis". *Journal of Internal Medicine*. (2018); Vol. 284 (1); 104-105.
- [10] - Alter H. J., Houghton M. "Hepatitis C Virus and eliminating post-transfusion hepatitis". *Nature Medicine*. (2000); Vol. 6 (10); 1082-1086.
- [11] - Fonseca J. C. F. "History of viral hepatitis". *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. (2010); Vol 43 (3); 322-330.
- [12] – Anjo J., Café A., Carvalho A., Doroana M., Fraga J., Gíria J., et al. "O impacto da hepatite C em Portugal". *Jornal Português de Gastreenterologia*. (2014); Vol. 21 (2); 44-54.
- [13] - Scheel T. K. H., Rice C. M. "Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies". *Nature Medicine*. (2013); Vol.19 (7); 837–849.
- [14] – Bartenschlager R., Cosset F. L., Lohmann V. "Hepatitis C virus replication cycle". *Journal of Hepatology*. (2010); Vol. 53; 583–585.
- [15] - Dubuisson J., Cosset F. L. "Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update". *Journal of Hepatology Update: Hepatitis C*. (2014); Vol. 61 (1); S3-S13.
- [16] - Goossens N., Clément S., Negro F. "Handbook of Hepatitis C". (2016); Chapter two; 13-18.
- [17] – Murphy D. G., Sablon E., Chamberland J., Fournier E., Dandavino R., Tremblay C. L. "Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa". *Journal of Clinical Microbiology*. (2015); Vol.53 (3); 967-972.
- [18] –Sharma S. D. "Hepatitis C virus: Molecular biology & current therapeutic options". *Indian Journal of Medical Research*. (2010); Vol.131; 17-34.

- [19] – F. Nouroz, S. Shaheen, G. Mujtaba, S. Noreen “An overview on hepatitis C virus genotypes and its control”. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics. (2015); Vol.16 (4); 291-298.
- [20] – Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. “Global epidemiology of hepatitis C virus infection: na up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes”. World Journal Gastroenterology. (2016); Vol. 22 (34); 7824-7840.
- [21] – Roche. (n.d.). *Hepatite C*. Disponível em <http://www.roche.pt/hepatites/hepatitec/>.
- [22] – Taherkhani R., Farshadpour F. “Global elimination of hepatitis C virus infection: Progresses and the remaining challenges”. World Journal of Hepatology. (2017). Vol. 9 (33); 1239- 1252.
- [23] – Kohara K. T., Kohara M. “Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes”. International Journal of Molecular Sciences. (2018); Vol. 19 (1); 23.
- [24] - HCV Advocate. (2016). *HCV Genotype, Quasispecies & Subtype*. Disponível em: http://hcvadvocate.org/hepatitis/factsheets_pdf/genotype.pdf.
- [25] – Moradpour D., Brass V., Gosert R., Wölk B., Blum H. E. “Hepatitis C: molecular virology and antiviral targets.” Trends in Molecular Medicine. (2002); Vol. 8 (10); 476–482.
- [26] - Kim C. W., Chang K.M. “Hepatitis C virus: virology and life cycle”. Clinical and Molecular Hepatology. (2013); Vol. 19 (1); 17-25.
- [27] – Lyra A.C., Fan X., Bisceglie A. M. “Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus”. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. (2004); Vol 37 (5); 691-695.
- [28] – Chevaliez S., Pawlotsky J. M. “Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy”. World Journal of Gastroenterology. (2007); Vol.13 (17); 2461-2466.
- [29] - Echeverría N., Moratorio G., Cristina J., Moreno P. “Hepatitis C virus genetic variability and evolution”. World Journal of Hepatology. (2015); Vol. 7 (6); 831-845.
- [30] - Moradpour D., Penin F., Rice C. M. “Replication of hepatitis C vírus”. Nature Reviews Microbiology. (2007); Vol. 5 (6); 453-63.
- [31] – Chen S. L., Morgan T. R. “The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection”. International Journal of Medical Sciences. (2006); Vol. 3 (2); 47-52.
- [32] – Zeisel M. B., Crouch E., Baumert T. F., Schuster C. “Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection”. Viruses. 2015; Vol. 7 (11); 5659-5685.
- [33] - Lindenbach B. D., Rice C. M. “Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function.” Nature. (2005); Vol. 436 (7053); 933-938.
- [34] - The European Union HCV Collaborators. “Hepatitis C virus prevalence and level of intervention required to achieve the WHO targets for elimination in the European Union by 2030: a modelling study”. The Lancet Gastroenterology & Hepatology. (2017); Vol. 2 (5); 325-336.
- [35] - Shepard C. W., Finelli L., Alter M. J. “Global epidemiology of hepatitis C virus infection”. The Lancet Infectious Diseases. (2005); Vol. 5 (9); 558-567.
- [36] – Hafez T. A. (2018). *Hepatitis C in Developing Countries: Current and Future Challenges*. DOI:10.1016/B978-0-12-803233-6.00003-5.

- [37] – Lavanchy D. “Evolving epidemiology of hepatitis C virus”. *Clinical Microbiology and Infection*. (2011); Vol. 17 (2); 107-115.
- [38] - Bartenschlager R., Baumert T. F., Bukh J., Houghton M., Lemon S. M., Lindenbach B. D., et al. “Critical Challenges and Emerging Opportunities in Hepatitis C Virus Research in an Era of Potent Antiviral Therapy: Considerations for Scientists and Funding Agencies”. *Virus Research*. (2018); Vol 248; 53-62.
- [39] – Kamal S. M., Ghoraba D. (2018). *Hepatitis C in Developing Countries: Current and Future Challenges*. DOI: 10.1016/B978-0-12-803233-6.00002-3.
- [40] - Marinho R. T., Moura M. C., Gíria J. A., Ferrinho P. “Epidemiological aspects of hepatitis C in Portugal”. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. (2001); Vol. 16 (9); 1076-1077
- [41] - Meng C., Li N., Tong Z., Yan H., Min S. “Reviews of Research on Risk Factors of Hepatitis C Virus Infection”. *Infection International*. (2015); Vol. 4 (1); 6-9.
- [42] – Wuytack F., Lutje V., Tohme R., Jakobsen J. C., Weiss K. H., Flanagan P., et al. “Sexual transmission of Hepatitis C Virus infection in a heterosexual population: A systematic review”. *HRB Open Research*. (2018); Vol. 1 (10); 1-16.
- [43] - Araújo T. M. E., Pinheiro D.M., Souza A.T.S. “Hepatitis C and associated risks in prisons: an integrative review.” *Rev. Fun Care Online*. (2017); Vol. 9 (4); 939-945.
- [44] – Lavanchy D. “Chronic viral hepatitis as a public health issue in the world.” *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. (2008); Vol. 22 (6); 991-1008.
- [45] – Fauteux-Daniel S., Larouche A., Calderon V., Boulais J., Béland C., Ransy D. G., et al. “Vertical Transmission of Hepatitis C Virus: Variable Transmission Bottleneck and Evidence of Midgestation In Utero Infection”. *Journal of Virology*. (2017); Vol. 91 (23); e01372-17.
- [46] – Cottrell E. B., Chou R., Wasson N., Rahman B., Guise J. M. “Reducing risk for mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force.” (2013); Vol. 158 (2); 109-113.
- [47] – Alter M. J. “HCV Routes of Transmission: What Goes Around Comes Around”. *Seminars in Liver Disease*. (2011); Vol. 31(4); 340-346.
- [48] - Villena E. Z. “Transmission routes of hepatitis C virus infection”. *Annals of Hepatology*. (2006); Vol. 5 (1); 12-14.
- [49] –Gupta E., Bajpai M., Choudhary A. “Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays”. *Asian Journal of Transfusion Science*. (2014); Vol. 8 (1); 19-25.
- [50] - Saludes V., González V., Planas R., Matas L., Ausina V., Martró E. “Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging”. *World Journal of Gastroenterology*. (2014); Vol. 20 (13); 3431-3442.
- [51] - Hepatitis C Online. (2018). *Evaluation and Staging of Liver Fibrosis*. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/6e68/b097e53cbaf0e7380f5008a2ed122e76cfe8.pdf>

- [52] - Trifan A., Stanciu C. "Checkmate to liver biopsy in chronic hepatitis C?". *World Journal of Gastroenterology*. (2012); Vol. 18 (39); 5514-5520.
- [53] - Behairy B. E., Sira M. M., Zalata K. R., Salama E. E., Abd-Allah M. A. "Transient elastography compared to liver biopsy and morphometry for predicting fibrosis in pediatric chronic liver disease: Does etiology matter?". *World Journal of Gastroenterology*. (2016); Vol. 22 (16); 4238-4249.
- [54] - Jung K. S., Kim S. U. "Clinical applications of transient elastography." *Clinical and molecular hepatology*. (2012); Vol. 18 (2); 163-173.
- [55] - Foucher J., Chanteloup E., Vergniol J., Castéra L., Le Bail B., Adhoute X., et al. "Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study." *Gut*. (2006); Vol. 55 (3); 403-408.
- [56] - Meng F., Zheng Y., Zhang Q., Mu X., Xu X., Zhang H., et al. "Noninvasive evaluation of liver fibrosis using real-time tissue elastography and transient elastography (FibroScan)." *Journal of Ultrasound in Medicine*. (2015); Vol. 34 (3); 403-410.
- [57] - Strader D. B., Wright T., Thomas D. L., Seeff L. B. "Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C." *Hepatology*. (2004); Vol. 39 (4); 1147-1171.
- [58] - Wang L. S., D'Souza L. S., Jacobson I. M. "Hepatitis C- A clinical review." *Journal of Medical Virology*. (2016); Vol. 88 (11); 1844-1855.
- [59] - Smith-Palmer J., Cerri K., Valentine W. "Achieving sustained virologic response in hepatitis C: a systematic review of the clinical, economic and quality of life benefits." *BMC Infectious Diseases*. (2015); Vol. 15 (19); 1-19.
- [60] - Poonia B., Kottilil S. "Newer therapeutics for hepatitis C." *Annals of Translational Medicine*. (2016); Vol. 4 (2); 1-3.
- [61] - Zhang X. "Direct anti-HCV agents". *Acta Pharmaceutica Sinica B*. (2016); Vol. 6 (1); 26-31.
- [62] - Petta S., Craxì A. "Current and future HCV therapy: do we still need other anti-HCV drugs?". *Liver International*. (2015); Vol. 35 (1); 4-10.
- [63] - Ken Research. (2017). *Hepatitis C Virus (HCV) Therapeutics-Global Drug Forecast and Market Analysis To 2025: Ken Research*. Disponível em: <https://www.kenresearch.com/blog/2017/04/hepatitis-c-virus-hcv-therapeutics-global-drug-forecast-market-analysis-2025-ken-research/>.
- [64] - Jakobsen J. C., Nielsen E. E., Feinberg J., Katakam K. K., Fobian K., Hauser G., et al. "Direct-acting antivirals for chronic hepatitis C." *Cochrane Database of Systematic Reviews*. (2017); CD012143.
- [65] - Biomy R., Abdelshafy M., Abdelmonem A., Abu-Elenin H., Ghaly G. "Effect of Chronic Hepatitis C Virus Treatment by Combination Therapy on Cardiovascular System". *Clinical Medicine Insights: Cardiology*. (2017). Vol. 11; 1-9.
- [66] - Unitaid. (2017). *Technology and Market Landscape for Hepatitis C Medicines*. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23302en/s23302en.pdf>.
- [67] - Asselah T., Marcellin P., Schinazi R. F. "Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure?". *Liver International*. (2018); Vol. 38 (1); 7-13.

- [68] - MD Magazine. (2018). *Virus-Like Particles Considered for Hepatitis C Vaccines*. Disponível em: <https://www.mdmag.com/medical-news/viruslike-particles-considered-for-hepatitis-c-vaccines>.
- [69] - A Enfermagem e as Leis. (2018). *Tratamento da hepatite C: Novo medicamento para tratar a doença está disponível no SNS*. Disponível em: <http://www.aenfermagemasleis.pt/2018/03/09/tratamento-da-hepatite-c-novo-medicamento-para-tratar-a-doenca-esta-disponivel-no-sns/>.
- [70] - Lusa (2018, março 8). *Novo medicamento disponível para hospitais e mais barato*. Público. Disponível em: <https://www.publico.pt/2018/03/08/sociedade/noticia/novo-medicamento-para-hepatite-c-disponivel-para-hospitais-e-mais-barato-1805865>.
- [71] – Seeff L. B. “Natural History of Hepatitis C”. *Hepatology*. (1997); Vol. 26 (3); 21S-28S.
- [72] – Cacoub P., Comarmond C., Domont F., Savey L., Desbois A. C., Saadoun. D. “Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection”. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. (2016); Vol. 3 (1); 3-15.
- [73] – World Health Organization. (2018). *Hepatitis C*. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
- [74] – Chung R. T. “Acute Hepatitis C Virus Infection”. *Clinical Infectious Diseases*. (2005); Vol.41 (1); 14-17.
- [75] – Lingala S., Ghany M. G. “Natural History of Hepatitis C”. *Gastroenterology Clinics of North America*. (2015); Vol. 44 (4); 717-734.
- [76] –Iñigo E. R., Bartolomé J., Lucas S., Manzarbeitia F., Pardo M., Arocena C., et al. “Histological Damage in Chronic Hepatitis C Is Not Related to the Extent of Infection in the Liver.” *The American Journal of Pathology*. (1999); Vol. 154 (6); 1877–1881.
- [77] - Doyle J. S., Hellard M. E., Thompson A. J. “The role of viral and host genetics in natural history and treatment of chronic HCV infection.” *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. (2012); Vol. 26 (4); 413-427.
- [78] –Thomas D. L., Thio C. L., Martin M. P., Qi Y., Ge D., O’Hugin C., et al. “Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus”. *Nature*. (2009); Vol. 461 (7265); 798-801.
- [79] – White D. L., Liu Y., Garcia J., El-Serag H. B., Jiao L., Tsavachidis S., et al. “Sex hormone pathway gene polymorphisms are associated with risk of advanced hepatitis C-related liver disease in males”. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*. (2014); Vol. 5 (3); 164-176.
- [80] – Di Martino V., Lebray P., Myers R. P., Pannier E., Paradis V., Charlotte F., et al. “Progression of Liver Fibrosis in Women Infected With Hepatitis C: Long-Term Benefit of Estrogen Exposure”. *Hepatology*. (2004); Vol. 40 (6); 1426-1433.
- [81] – Wiley T. E, Brown J., Pharm J. C. “Hepatitis C infection in African Americans: its natural history and histological progression”. *American Journal of Gastroenterology*. (2002); Vol. 97 (3); 700-706.

- [82] – Sterling R. K., Stravitz R. T., Luketic V. A., Sanyal A. J., Contos M. J., Mills A. S., et al. “A Comparison of the Spectrum of Chronic Hepatitis C Virus Between Caucasians and African Americans.” *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. (2004); Vol. 2(6); 469-473.
- [83] - Nobili V., Carter-Kent C., Feldstein A. E. “The role of lifestyle changes in the management of chronic liver disease.” *BMC Medicine*. (2011); Vol. 9 (1); 1.
- [84] - McKenna O., Cunningham C., Gissane C., Blake C. “Management of the extrahepatic symptoms of chronic hepatitis C: feasibility of a randomized controlled trial of exercise.” *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. (2013); Vol. 92 (6); 504-512.
- [85] - El-Kader S. M. A., Al-Jiffri O. H., Al-Shreef F. M. “Liver enzymes and psychological well-being response to aerobic exercise training in patients with chronic hepatitis C.” *African Health Sciences*. (2014); Vol. 14 (2); 414-419.
- [86] - Ortiz V., Berenguer M., Rayón J. M., Carrasco D., Berenguer J. “Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression.” *American Journal of Gastroenterology*. (2002); Vol. 97 (9); 2408-2414.
- [87] - Hickman I. J., Powell E. E., Prins J. B., Clouston A. D., Ash S., Purdie D. M., et al. “In overweight patients with chronic hepatitis C, circulating insulin is associated with hepatic fibrosis: implications for therapy.” *Journal of Hepatology*. (2003); Vol. 39 (6); 1042-1048.
- [88] - Negro F., Sanyal A. J. “Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data”. *Liver International*. (2009); Vol. 29 (2); 26-37.
- [89] - Hourigan L. F., Macdonald G. A., Purdie D., Whitehall V.H., Shorthouse C., Clouston A., et al. “Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis.” *Hepatology*. (1999); Vol. 29 (4); 1215-1219.
- [90] - Adinolfi L. E., Gambardella M., Tripodi A. A. M., Utili R., Ruggiero G. “Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity”. *Hepatology*. (2001); Vol. 33 (6); 1358-1364.
- [91] - Hsu C. S., Liu C. J., Liu C. H., Chen C. L., Lai M. Y., Chen P. J., et al. “Metabolic profiles in patients with chronic hepatitis C: a case-control study.” *Hepatology International*. (2008); Vol. 2 (2); 250-257.
- [92] - Handerson F., Zeng L., Rock N. R., Yoshida E. M. “An assessment of the clinical utility of serum ALT and AST in chronic hepatitis C”. *Hepatology Research*. (2000); Vol. 18 (1); 63-71.
- [93] - Ruhl C. E., Menke A., Cowie C. C., Everhart J. E. “The Relationship of Hepatitis C Virus Infection with Diabetes in the United States Population”. *Hepatology*. (2014); Vol. 60 (4); 1139-1149.
- [94] - Naing C., Mak J. W., Ahmed S. I., Maung M. “Relationship between hepatitis C virus infection and type 2 diabetes mellitus: Meta-analysis”. *World Journal of Gastroenterology*. (2012); Vol. 18 (14); 1642-1651.

- [95] - Gastaldi G., Goossens N., Clément S., Negro F. “Current level of evidence on causal association between hepatitis C virus and type 2 diabetes: A review”. *Journal of Advanced Research*. (2017). Vol. 8 (2); 149-159.
- [96] - Wu Y. J., Xu M. Y., Lu L. G. “Clinical Advances in Fibrosis Progression of Chronic Hepatitis B and C”. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. (2014); Vol. 2 (4); 222-227.
- [97] - Williams A. S., Kang L., Wasserman D. H. “The extracellular matrix and insulin resistance.” *Trends in Endocrinology and Metabolism*. (2015); Vol. 26 (7); 357-366.
- [98] – Minola E., Prati D., Suter F., Maggiolo F., Caprioli F., Sonzogni A., et al. “Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C”. *Blood Journal*. (2002). Vol. 99 (12); 4588-4591.
- [99] - Probst A., Dang T., Bochud M., Egger M., Negro F., Bochud P. Y. “Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis.” *Journal of Viral Hepatitis*. (2011); Vol. 18 (11); 745-759.
- [100] - De Nicola S., Aghemo A., Rumi M.G., Colombo M. “HCV genotype 3: an independent predictor of fibrosis progression in chronic hepatitis C.” *Journal of Hepatology*. (2009); Vol. 51 (5); 964-966.
- [101] - Konstantinou D., Deutsch M. “The spectrum of HBV/HCV coinfection: epidemiology, clinical characteristics, viral interactions and management.” *Annals of Gastroenterology*. (2015); Vol. 28 (2); 221-228.
- [102] - Pace F. H., Ferreira L. E., Silva A. E., Ferraz M. L. “Liver fibrosis progression in HIV/hepatitis C virus coinfecting patients with normal aminotransferases levels.” *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. (2012); Vol. 45 (4); 444-447.
- [103] - Mallat A., Hezode C., Lotersztajn S. “Environmental factors as disease accelerators during chronic hepatitis C.” *Journal of Hepatology*. (2008); Vol. 48 (4); 657-665.
- [104] - Marrero J. A., Fontana R. J., Fu S., Conjeevaram H. S., Su G. L., Lok A. S. “Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma.” *Journal of Hepatology*. (2005); Vol. 42 (2); 218-224.
- [105] – Hézode C., Lonjon I., Roudot-Thoraval F., Mavrier J. P., Pawlotsky J.M., Zafrani E. S., et al. “Impact of smoking on histological liver lesions in chronic hepatitis C.” *Gut*. (2003); Vol. 52 (1); 126-129.
- [106] – Julien B., Grenard P., Teixeira-Clerc F., Van Nhieu J. T., Li L., Karsak M., et al. “Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver.” *Gastroenterology*. (2005); Vol. 128 (3); 742-755.
- [107] – Hézode C., Roudot-Thoraval F., Nguyen S., Grenard P., Julien B., Zafrani E.S., et al. “Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C.” *Hepatology*. (2005); Vol. 42 (1); 63-71.
- [108] – Van der Poorten D., Shahidi M., Tay E., Sessa J., Tran K., McLeod D., et al. “Hepatitis C virus induces the cannabinoid receptor 1.” *PLOS One*. (2010); Vol. 5 (9); e12841.

- [109] – Honjo S., Kono S., Coleman M. P., Shinchu K., Sakurai Y., Todoroki I., et al. “Coffee consumption and serum aminotransferases in middle-aged Japanese men.” *Journal of Clinical Epidemiology*. (2001); Vol. 54 (8); 823-829.
- [110] – Ruhl C. E., Everhart J. E. “Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States.” *Gastroenterology*. (2005); Vol. 128 (1); 24-32.
- [111] – McCaughan G. W., George J. “Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection”. *Gut*. (2004); Vol. 53 (3); 318–321.
- [112] – Forrest E. H., Thorburn D., Spence E., Oien K. A., Inglis G., Smith C.-A., et al. “Polymorphisms of the renin–angiotensin system and the severity of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection”. *Journal of Viral Hepatitis*. (2005); Vol.12 (5); 519-524.
- [113] – Shepard C. W., Finelli L., Alter M. J. “Global epidemiology of hepatitis C virus infection”. *The Lancet – Infectious Diseases*. (2005); Vol. 5 (9); 558-567.
- [114] – Prestigiacomo V., Weston A., Messner S., Lampart F., Suter-Dick L. “Pro-fibrotic compounds induce stellate cell activation, ECM-remodelling and Nrf2 activation in a human 3D-multicellular model of liver fibrosis.” *PLOS One*. (2017); Vol. 12 (6); e0179995.
- [115] – Sebastiani G., Gkouvatsos K., Pantopoulos K. “Chronic hepatitis C and liver fibrosis.” *World Journal of Gastroenterology*. (2014); Vol. 20 (32); 11033-11053.
- [116] – Lingwal P., Bhatt G. K., Kothiyal P. “Hepatic Stellate Cells as a Target for the Treatment of Liver Fibrosis”. *International Journal of Pharma*. (2015); Vol. 4 (7); 32-37.
- [117] – Iredale J. P., Thompson A., Henderson N. C. “Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation.” *BBA Molecular Basis of Disease*. (2013); Vol. 1832 (7); 876-883.
- [118] – Lu P., Liu H., Yin H., Yang L. “Expression of angiotensinogen during hepatic fibrogenesis and its effect on hepatic stellate cells.” *Medical Science Monitor*. (2011); Vol. 17 (9); 248-256.
- [119] – Bataller R., Brenner D. A. “Liver fibrosis.” *The Journal of Clinical Investigation*. (2005); Vol. 115 (2); 209-218.
- [120] – Schuppan D., Ashfaq-Khan M., Yang A. T., Kim Y.O. “Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies.” *Matrix Biology*. (2018); Vol. 68-69.; 435-451.
- [121] – Huang G. “Function of Collagens in Energy Metabolism and Metabolic Diseases.” *Journal of Cell Science & Therapy*. (2014); Vol. 5 (4); 1-7.
- [122] – Liu T., Wang X., Karsdal M. A., Leeming D. J., Genovese F. “Molecular Serum Markers of Liver Fibrosis.” *Biomarker Insights*. (2012); Vol. 7; 105–117.
- [123] - Nallagangula K. S., Nagaraj S. K., Venkataswamy L., Chandrappa M. “Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression.” *Future Science OA*. (2017); Vol. 4 (1); FSO250.
- [124] - Cassat J. E., Skaar E. P. “Iron in Infection and Immunity.” *Cell Host Microbe*. (2013); Vol. 13 (5); 509-519.

- [125] - Grotto H. Z. W. "Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis." *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. (2008); Vol. 30 (5); 390-397.
- [126] - Recalcatti S., Locati M., Cairo G. "Systemic and cellular consequences of macrophage control of iron metabolism." *Seminars in Immunology*. (2012); Vol. 24 (6); 393-398.
- [127] - Kali A., Charles M. V., Seetharam R. S. "Hepcidin - A novel biomarker with changing trends." *Pharmacognosy Reviews*. (2015); Vol. 9 (17); 35-40.
- [128] – Pietrangelo A. "Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis." *Journal of Hepatology*. (1998); Vol. 28; 8-13.
- [129] – Guyader D., Thirouard A. S., Erdtmann L., Rakba N., Jacquelinet S., Danielou H., et al. "Liver iron is a surrogate marker of severe fibrosis in chronic hepatitis C." *Journal of Hepatology*. (2007); Vol. 46 (4); 587-595.
- [130] – Pirisi M., Scott C. A., Avellini C., Toniutto P., Fabris C., Soardo G., et al. "Role of Interface Hepatitis, Portal Inflammation, and HFE Missense Mutations." *American Journal of Clinical Pathology*. (2000); Vol. 113 (4); 546-554.
- [131] – Beinker N. K., Voigt' M. D., Arendse M., Smit J., Stander I. A., Kirsch' R. E. "Threshold effect of liver iron content on hepatic inflammation and fibrosis in hepatitis B and C." *Journal of Hepatology*. (1996); Vol. 25 (5); 633-638.
- [132] – Metwally M. A., Zein C. O., Zein N. N. "Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection." *The American Journal of Gastroenterology*. (2004); Vol. 99 (2); 286-291.
- [133] - Andrade V. G., Yamashiro F. S., Oliveira C. V., Kurozawa L. L., Moreira A., Silva G. F. "Increase of lipids during HCV Treatment: Virus Action or Medication?" *Arquivos de Gastroenterologia*. (2018); Vol. 55 (2); 184-187.
- [134] - Bassendine M. F., Sheridan D. A., Bridge S.H., Felmlee D. J., Neely R. D. G. "Lipids and HCV." *Seminars in Immunopathology*. (2013); Vol. 35 (1); 87-100.
- [135] – Nishida T. "Diagnosis and Clinical Implications of Diabetes in Liver Cirrhosis: A Focus on the Oral Glucose Tolerance Test." *Journal of the Endocrine Society*. (2017); Vol. 1 (7); 886–896.
- [136] - Hui J. M., Sud A., Farrell G. C., Bandara P., Byth K., Kench J. G., et al. "Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression." *Gastroenterology*. (2003); Vol. 125 (6); 1695-1704.
- [137] – Balogh J., Victor D., Asham E. H., Burroughs S. G., Boktour M., Saharia A., et al. "Hepatocellular carcinoma: a review". *Journal of Hepatocellular Carcinoma*. (2016); Vol. 3; 41-53.
- [138] – McGlynn K. A., London W. T. "The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future." *Clinics in liver disease*. (2011); Vol. 15 (2); 223-243.
- [139] – Galle P. R., Forner A., Llovet J. M., Mazzaferro V., Piscaglia F., Raoul J. L., et al. "EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma." *Journal of Hepatology*. (2018); Vol. 69 (1); 182-236.

- [140] – Zamor P. J., deLemos A. S., Russo M. W. “Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma: etiology and management.” *Journal of Gastrointestinal Oncology*. (2017); Vol. 8 (2); 229- 242.
- [141] – Vescovo T., Refolo G., Vitagliano G., Fimia G. M., Piacentini M. “Molecular mechanisms of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma.” *Clinical Microbiology and Infection*. (2016); Vol. 22 (10); 853–861.
- [142] - Bataller R., North K. E., Brenner D. A. “Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal.” *Hepatology*. (2003); Vol. 37 (3); 493-503.
- [143] – Munshi M. K., Uddin M. N., Glaser S. S. “The role of the renin–angiotensin system in liver fibrosis”. *Experimental Biology and Medicine*. (2011); Vol. 236 (5); 557-566.
- [144] – Ahmadian E., Pennefather P. S., Eftekhari A., Heidari R., Eghbal M. A. “Role of renin-angiotensin system in liver diseases: An outline on the potential therapeutic points of intervention”. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. (2016); Vol. 10 (16); 1279-1288.
- [145] - Shim K. Y., Eom Y. W., Kim M. Y., Kang S. H., Baik S. K. “Role of the renin-angiotensin system in hepatic fibrosis and portal hypertension.” *The Korean Journal of Internal Medicine*. (2018); Vol. 33 (3); 453-461.
- [146] – Murphy A. M., Wong A. L., Bezuhly M. “Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis”. *Fibrogenesis Tissue Repair*. (2015); Vol. 8; 1-7.
- [147] - Patel V. B., Parajuli N., Oudit G. Y. “Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in diabetic cardiovascular complications.” *Clinical Science*. (2014); Vol. 126 (7); 471-482.
- [148] – Reese L. J., Tider D. S., Stivala A. C., Fishbein D. A. “Effects of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors on Liver Fibrosis in HIV and Hepatitis C Coinfection.” *AIDS Research and Treatment*. (2012); Vol. 2012; 978790.
- [149] - Macêdo S. M., Guimarães T. A., Feltenberger J. D., Santos S. H. S. “The role of renin-angiotensin system modulation on treatment and prevention of liver diseases.” *Peptides*. (2014); Vol. 62; 189-196.
- [150] –Wang W. Z. “Association between T174M polymorphism in the angiotensinogen gene and risk of coronary artery disease: a meta-analysis.” *Journal of Geriatric Cardiology*. (2013); Vol. 10 (1); 59-65.
- [151] –Kolovou V., Lagou E., Mihas C., Vasiliki G., Katsiki N., Kollia A., et al. “Angiotensinogen (AGT) M235T, AGT T174M and Angiotensin-1- Converting Enzyme (ACE) I/D Gene Polymorphisms in Essential Hypertension: Effects on Ramipril Efficacy.” *The Open Cardiovascular Medicine Journal*. (2015); Vol. 9; 118-126.
- [152] – Ou Z., Chen H., Liu G., Li C., Lin S., Lin J. “Association between angiotensinogen T174M polymorphism and ischemic stroke: A meta-analysis.” *Journal of Research in Medical Sciences*. (2015); Vol. 20 (6); 619-623.
- [153] - Charita B., Padma G., Sushma P., Deepak P., Padma T. “Estimation of risk and interaction of single nucleotide polymorphisms at angiotensinogen locus causing susceptibility to essential

hypertension: a case control study.” *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. (2012); Vol. 13 (4); 461-471.

[154] - Araújo M. A., Menezes B. S., Lourenço C., Cordeiro E. R., Gatti R. R., Goular L. R. “O gene do angiotensinogênio (M235T) e o infarto agudo do miocárdio”. *Revista da Associação Médica Brasileira*. (2005); Vol. 51 (3); 164-169.

[155] – Molina-Molina M., Xaubet A., Li X., Abdul-Hafez A., Friderici K., Jernigan K., et al. “Angiotensinogen gene G-6A polymorphism influences idiopathic pulmonary fibrosis disease progression.” *The European Respiratory Journal*. (2008); Vol. 32 (4); 1004-1008.

[156] – Sakata T., Takenaga N., Endoh T., Wada O., Matsuk K. “Diagnostic Significance of Serum Angiotensin-Converting Enzyme Activity in Biochemical Tests with Special Reference to Chronic Liver Diseases”. *Japanese Journal of Medicine*. (1991); Vol.30 (5); 402-407.

[157] – Sharifi N., Khajeh K., Mahernia S., Balalaie S., Ataie G., Jahanbani R., et al. “Probing Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Domain-Dependent Inhibition of Onopordia, Isolated from *Onopordon acanthium* L., Using a Continuous Fluorescent Assay.” *Pharmaceutical Sciences*. (2018); Vol. 24 (1); 31-37.

[158] – Masuyer G., Douglas R. G., Sturrock E. D., Acharyab K. R. “Structural basis of Ac-SDKP hydrolysis by Angiotensin-I converting enzyme.” *Scientific Reports*. (2015); 5:13742.

[159] – Almeida S. S., Barros C. C., Moraes M. R., Russo F. J., Haro A. S., Rosa T. S., et al. “Plasma Kallikrein and Angiotensin I-converting enzyme N- and C-terminal domain activities are modulated by the insertion/deletion polymorphism.” *Neuropeptides*. (2010); Vol. 44 (2); 139-143.

[160] – Danilov S. M., Wade M. S., Schwager S. L., Douglas R. G., Nesterovitch A. B., Popova I. A., et al. “A novel angiotensin I-converting enzyme mutation (S333W) impairs N-domain enzymatic cleavage of the anti-fibrotic peptide, AcSDKP.” *PLoS One*. (2014); Vol. 9(2); e88001.

[161] – Shen X. Z., Bernstein K. E. “The peptide network regulated by angiotensin converting enzyme (ACE) in hematopoiesis.” *Cell Cycle*. (2011); Vol. 10 (9); 1363-1369.

[162] – Yuan F., Zhang L. S., Li H. Y., Liao M., Lv M., Zhang C. “Influence of Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Polymorphism on Hepatocellular Carcinoma Risk in China”. *DNA and Cell Biology*. (2013); Vol. 32 (5); 268-273.

[163] – Hilgers K. F., Langenfeld R.W., Schlaich M., Veelken R., Schmieder R. E. “1166 A/C Polymorphism of the Angiotensin II Type 1 Receptor Gene and the Response to Short-Term Infusion of Angiotensin II”. *Circulation*. (1999); Vol. 100 (13); 1394-1399.

[164] – Baudin B. “Polymorphism in angiotensin II receptor genes and hypertension”. *Experimental Physiology*. (2004); Vol. 90 (3); 277-282.

[165] - Singh A., Srivastava N., Amit S., Prasad S. N., Misra M. P., Ateeq B. “Association of AGTR1 (A1166C) and ACE (I/D) Polymorphisms with Breast Cancer Risk in North Indian Population.” *Translational Oncology*. (2018); Vol. 11 (2); 233-242.

- [166] - Sandrin L., Fourquet B., Hasquenoph J. M., Yon S., Fournier C., Mal F., et al. "Transient elastography: a new non-invasive method for assessment of hepatic fibrosis." *Ultrasound in Medicine & Biology* (2003); Vol. 29 (12); 1705-1713.
- [167] - Serejo F., Marinho R., Velosa J., Costa A., Moura M. C. "Elastografia hepática transitória, um método não invasivo para avaliação da fibrose em doentes com hepatite C crônica." *GE - Jornal Português de Gastroenterologia*. (2007); Vol. 14 (1); 8-14.
- [168] – Lahiri D., Nurnberger J. "A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies." *Nucleic Acids Research*. (1991); Vol.19 (19): 5444.
- [169] - Garibyan L., Avashia N. "Polymerase Chain Reaction." *Journal of Investigative Dermatology*. (2013); Vol. 133 (3); 1- 4.
- [170] – Ishmael F. T., Stellato C. "Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician." *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. (2008); Vol. 101 (4); 437-443.
- [171] – Pacheco A. R., Guerrero S. S. M., Sanson A. M. "Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico." *Gaceta Mexicana de Oncología*. (2013); Vol.12 (3); 162-173.
- [172] – Yılmaz M., Ozic C., Gok İ. (2012). "Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis." In: *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. Chapter: 3; 33-40. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/principles-of-nucleic-acid-separation-by-agarose-gel-electrophoresis>.
- [173] – Profissão Biotec. (n.d.). *Eletroforese*. Disponível em: <http://profissaobiotec.com.br/5-ferramentas-fundamentais-para-a-engenharia-genetica/eletroforese/>.
- [174] – Fathy W. M., Montaser B. A., El-Assal M. "Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism (insertion/deletion) and The Risk of Hepatocellular Carcinoma in Egyptian HCV and HBV Patients." *Journal of American Science*. (2016); Vol. 12 (3); 116-124.
- [175] – Lima L., Martins J., Nader H., Lacet C., Balwani M., Pinhal M. "Predictive value of serum markers of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C." *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. (2008); Vol. 44 (3); 185-191.
- [176] – Esmat G., Metwally M., Zalata K. R., Gadalla S., Abdel-Hamid M., Abouzied A., et al. "Evaluation of serum biomarkers of fibrosis and injury in Egyptian patients with chronic hepatitis C." *Journal of Hepatology*. (2007); Vol. 46 (4); 620-627.
- [177] – Fusegawa H., Shiraishi K., Ogasawara F., Shimizu M., Haruki Y., Miyachi H., et al. "Platelet activation in patients with chronic hepatitis C." *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*. (2002); Vol. 27 (4); 101-106.
- [178] - Pereboom I. T., Lisman T., Porte R. J. "Platelets in liver transplantation: Friend or foe?" *Liver Transplantation*. (2008); Vol. 14 (7); 923-931.
- [179] – Hepcentro. (2007). *Esplenomegalia, Hiperesplenismo e Esplenectomia*. Disponível em: <http://www.hepcentro.com.br/esplenomegalia.htm>.

- [180] - Nurden A. T. "Platelets, inflammation and tissue regeneration." *Thrombosis and Haemostasis*. (2011); Vol. 105 (6); 13-33.
- [181] - Lesurtel M., Graf R., Aleil B., Walther D. J., Tian Y., Jochum W., et al. "Platelet-Derived Serotonin Mediates Liver Regeneration." *Science*. (2006); Vol. 312 (5770), 104-107.
- [182] - Mann D. A., Oakley F. "Serotonin paracrine signaling in tissue fibrosis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. (2013). Vol. 1832 (7); 905-910.
- [183] - Branton M. H., Kopp J. B. "TGF-beta and fibrosis." *Microbes and Infection*. (1999). Vol. 1 (15); 1349-1365.
- [184] – Koda M., Matunaga Y., Kawakami M., Kishimoto Y., Suou T., Murawaki Y. "FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C." *Hepatology*. (2007); Vol. 45 (2); 297-306.
- [185] –Vagu C., Sultana C., Ruta S. "Serum Iron Markers in Patients With Chronic Hepatitis C Infection." *Hepatitis Monthly*. (2013); Vol. 13 (10); e13136.
- [186] – Kim W. R., Flamm S. L., Di Bisceglie A. M., Bodenheimer H. C. "Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease." *Hepatology*. (2008); Vol. 47 (4); 1363-1370.
- [187] – Grigorescu M., Rusu M., Neculoiu D., Radu C., Serban A., Catanas M., et al. "The FibroTest value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. The Romanian experience." *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. (2007); Vol. 16 (1); 31-37.
- [188] – Imbert-Bismut F., Ratziu V., Pieroni L., Charlotte F., Benhamou Y., Poynard T. "Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study." *Lancet*. (2001); Vol. 357 (9262); 1069-1075.
- [189] – Shiota G., Umeki K., Okano J., Kawasaki H. "Hepatocyte growth factor and acute phase proteins in patients with chronic liver diseases." *Journal of Medicine*. (1995); Vol. 26 (5-6); 295-308.
- [190] –Ghadir M. R., Riahin A. A., Havaspour A., Nooranipour M., Habibinejad A. A. "The relationship between lipid profile and severity of liver damage in cirrhotic patients." *Hepatitis Monthly*. (2010); Vol. 10 (4); 285–288.
- [191] –Nogueira C. T., Urbaczek A. C., Falcowski T. O. R., Isabel T. F, Graminha. M. A. S., Costa P. I. "Evaluation of the lipid profile between individuals with hepatitis C." *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. (2012); Vol. 33(1); 63-70.
- [192] - Cherayil B. J. "Pathophysiology of iron homeostasis during inflammatory states." *The Journal of Pediatrics*. (2015); Vol. 167 (0); 15 - 19.
- [193] –Fargion S., Valenti L., Fracanzani A. L. "Beyond hereditary hemochromatosis: New insights into the relationship between iron overload and chronic liver diseases." *Digestive and Liver Disease*. (2011); Vol. 43 (2); 89-95.

- [194] – Girelli D., Pasino M., Goodnough J. B., Nemeth E., Guido M., Castagna A., et al. “Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C.” *Journal of Hepatology*. (2009); Vol. 51 (5); 845-852.
- [195] – Milic S., Mikolasevic I., Orlic L., Devcic E., Starcevic-Cizmarevic N., Stimac D., et al. “The Role of Iron and Iron Overload in Chronic Liver Disease.” *Medical Science Monitor*.” (2016); Vol. 22; 2144-2151.
- [196] – Lebray P., Zylberberg H., Hue S., Poulet B., Carnot F., Martin S., et al. “Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C.” *Journal of Viral Hepatitis*. (2004). Vol 11 (2); 175–182.
- [197] – Adams P. C., Beaton M. D. “Transferrin saturation as a predictor of hepatic iron overload.” *Liver International*. (2011); Vol. 31(2); 272-273.
- [198] –Arain S. A., Jamal Q., Omair A. ““Liverscore” is predictive of both liver fibrosis and activity in chronic hepatitis C.” *World Journal of Gastroenterology*. (2011); Vol. 17 (41); 4607–4613.
- [199] – Michalczuk M. T., Kappel C. R., Birkhan O., Bragança A. C., Silva M. R. “HOMA-AD in Assessing Insulin Resistance in Lean Noncirrhotic HCV Outpatients.” *International Journal of Hepatology*. (2012); ID 576584.
- [200] –Drăguț R. M., Rusu E., Enache G., Popescu H., Nan R., Radulian G. “Liver and Metabolic Diseases.” *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases*. (2016); Vol. 23 (1); 105-112.
- [201] –Raslan H. M., Amr K. S., Elhosary Y. A., Ezzat W. M., Abdullah N. A., El-Batae H. E. “Possible role of angiotensin-converting enzyme polymorphism on progression of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C virus infection.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. (2011); Vol. 105 (7); 396-400.
- [202] –Amr K. S., Ezzat W. M., El-Hossary Y. A., Abdulla N. A., El-Batae H. E., Raslan H. M. “Angiotensin Converting Enzyme I/D Polymorphism and Chronic Hepatitis C Virus Infection.” *Medical Journal of Cairo University*. (2009); Vol. 77 (4); 255-259.
- [203] – Turhan N. K., Ilikhan S. U., Hamamcioglu A. C., Ustundag Y., Dursun A., Kokturk F. “Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism (insertion/deletion) and liver fibrosis in Turkish patients from the western Black Sea region, Turkey.” *Genetics and molecular research*. (2015); Vol. 14 (4); 17079-17090.
- [204] – Pei Y., Scholey J., Thai K., Suzuki M., Cattran D. “Association of angiotensinogen gene T235 variant with progression of immunoglobulin A nephropathy in Caucasian patients.” *The Journal of Clinical Investigation*. (1997); Vol. 100 (4); 814-820.
- [205] –Lau Y. K., Woo K. T., Choong H. L., Zhao Y., Tan H. B., Chong S. M., et al. “Renin-angiotensin system gene polymorphisms: its impact on IgAN and its progression to end-stage renal failure among Chinese in Singapore.” *Nephron Physiology*. (2004); Vol. 97 (1); 1-8.

- [206] – Woo K. T., Lau Y. K., Choong L. H., Zhao Y., Tan H. B., Fook-Chong S., et al. “Polymorphism of renin-angiotensin system genes in IgA nephropathy.” *Nephrology*. (2004); Vol. 9 (5); 304-309.
- [207] – Ono M., Ochi T., Munekage K., Ogasawara M., Hirose A., Nozaki Y., et al. “Angiotensinogen gene haplotype is associated with the prevalence of Japanese non-alcoholic steatohepatitis.” *Hepatology Research*. (2011); Vol. 41 (12); 1223-1229.
- [208] – Powell E. E., Edwards-Smith C. J., Hay J. L., Clouston A. D., Crawford D. H., Shorthouse C., et al. “Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C.” *Hepatology*. (2000); Vol. 31 (4); 828-833.
- [209] – Mackawy A. M. H., Badawy M. E. H., El-Rahman O. A., Megahed Y. “Angiotensin converting enzyme (ACE D/I) polymorphism and its relation to liver fibrosis progression in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus infection.” *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. (2012); Vo. 13 (3); 291-299.
- [210] – Tekatas D. D., Bahcecioglu I. H., Ispiroglu M., Sahin A., Ilhan N., Yalniz M., et al. “Role of Renin-Angiotensin-converting Enzyme Level and ACE Gene Polymorphism in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Euroasian Journal of Hepatogastroenterology*. (2016); Vol. 6 (2); 137–142.
- [211] – Elsammak M. Y. M., El Banawy H. S., Mahmoud M. “Angiotensin Converting Enzyme Gene I/D polymorphism correlates with complications in HCV infected Egyptian Patients.” *Global Journal of Medical Research*. (2011); Vol. 11 (5).

8. ANEXOS

Anexo 1

Extração não enzimática de DNA de leucócitos diretamente de sangue periférico

Preparação dos Reagentes:

Tabela Suplementar 8.1 – Soluções e respectivos componentes de PCR.

Soluções	Componentes das soluções
TKM 1	10 mL de Tris-HCL ph 7,6
	KCl 10 mM
	MgCl ₂ 10 mM
	EDTA 2 mM
TKMX-100	2,5% (v/v) de Triton X-100 em tampão TKM1
TKM 2	Tris-HCl pH 7,6 10 mM
	KCl 10 mM
	MgCl ₂ 10 mM
	NaCl 0,4 M
	EDTA 2 mM
Tampão TE	Tris-HCl 10 mM pH 8 + EDTA 1 mM

Reagentes Preparados

- IGEPAL CA 630
- SDS 10%
- NaCl saturado (6M)
- Etanol Absoluto

Protocolo Experimental

1. O sangue periférico é colhido num tubo com anticoagulante EDTA.
2. Transfere-se 2mL para um tubo rolhado e graduado de 10mL.
3. Adiciona-se 1 volume de TKM X-100 tendo o cuidado de adicionar parte deste tubo onde a amostra foi colhida de forma a evitar desperdícios de sangue.
4. Adiciona-se 50mL de IPGEPAL CA 630 por cada mL de sangue, com o objectivo de lisar as células, com consequente libertação de DNA e outros constituintes celulares.
5. O tubo é agitado 4-5 vezes por inversão vigorosa.
6. Segue-se uma centrifugação a 2200rpm, à temperatura de aproximadamente 4°C, durante 15min, que deve ser repetida caso o pellet formado não adira ao fundo do tubo.
7. O sobrenadante é rejeitado e ao pellet que contém, entre outros constituintes, o DNA, é adicionado 2mL de tampão TKM 1 por cada mL de sangue.
8. Centrifuga-se à mesma temperatura, a 1600rpm e por um período de 10min e são repetidos os passos de rejeição do sobrenadante e adição de tampão TKM 1.
9. O passo anterior é repetido no máximo 2 vezes, de forma a obter um pellet branco, evitando assim perdas excessivas de DNA.
10. Ressuspende-se o pellet (vórtex) na solução TKM 2 numa proporção de 160mL de tampão por mL de sangue.
11. Adiciona-se 20mL de SDS 10% por mL de sangue e a mistura é ressuspensa com o auxílio de uma micropipeta. Este reagente dissolve as proteínas ainda existentes em solução.
12. Incuba-se a 55°C durante 10min.
13. Ao fim deste intervalo de tempo o conteúdo do tubo é transferido para um eppendorf ao qual se adicionam 60µL de NaCl saturado por mL de sangue. Visualiza-se de imediato a precipitação de proteínas existentes na suspensão de DNA que formam uma fase branca opaca distinta de outra completamente transparente (suspensão de DNA).
14. Agita-se o tubo eppendorf (vórtex).
15. Centrifuga-se (centrífuga de eppendorfs) a 1200rpm, à temperatura ambiente e por 30min (salting-out).
16. Verte-se o sobrenadante, que contém o DNA, resultante da centrifugação anterior para um tubo de vidro e adicionam-se 2 volumes de etanol absoluto gelado (colocado a -20°C, cerca de 5min antes de ser utilizado).
17. O tubo, devidamente selado com parafilme, é invertido suavemente até precipitação do DNA.
18. Ressuspende-se o DNA em 200µL de tampão TE previamente colocados no tubo eppendorf devidamente rotulado e armazena-se a 4°C.

Anexo 2

Tamanho da banda (pb)

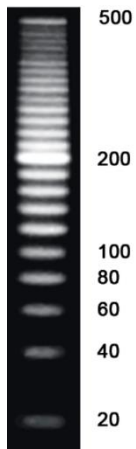


Figura suplementar 8.1. - NZYDNA Ladder IV - Marcador de peso molecular. Produz um padrão de 25 bandas regularmente espaçadas, variando entre 20 a 500 pb.

Anexo 3

Tabela Suplementar 8.2 - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) com os genótipos (II ou ID versus DD) do gene ECA na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	ECA	N	Média	Desvio Padrão	Variâncias iguais assumidas*	ρ^{**}
Idade	Anos	II ou ID	58	53,71	12,17	Sim	0,641
		DD	56	54,75	11,61		
IMC	Kg/m ²	II ou ID	54	26,54	10,06	Sim	0,306
		DD	51	24,99	4,02		
RNA	UI/mL	II ou ID	57	1,78E+06	2,49E+06	Sim	0,196
		DD	57	2,71E+06	4,81E+06		
Plaquetas	U/mm ³	II ou ID	57	2,08E+05	7,74E+04	Sim	0,346
		DD	57	1,95E+05	7,39E+04		
Fosfatase Alcalina	UI/mL	II ou ID	58	81,86	29,73	Sim	0,527
		DD	56	77,77	38,69		
AST	UL/mL	II ou ID	58	57,29	36,00	Sim	0,748
		DD	57	55,39	26,60		
ALT	UL/mL	II ou ID	58	71,95	45,94	Sim	0,809
		DD	57	74,23	54,73		
GAMA GT	UL/mL	II ou ID	58	87,59	98,71	Sim	0,536
		DD	57	77,42	75,31		
Colesterol total	mmol/L	II ou ID	56	4,34	0,98	Sim	0,793
		DD	57	4,39	0,86		
HDL	mmol/L	II ou ID	55	1,66	0,70	Não	0,169
		DD	56	1,49	0,54		
LDL	mmol/L	II ou ID	54	2,41	0,82	Sim	0,719
		DD	54	2,46	0,81		
Triglicéridos	mmol/L	II ou ID	57	1,25	0,71	Sim	0,117
		DD	57	1,07	0,46		
APOA1	g/L	II ou ID	56	1,66	0,45	Não	0,178
		DD	52	7,04	28,37		
Ferro	mg/dL	II ou ID	58	126,12	50,42	Sim	0,920
		DD	54	127,02	43,51		
Ferritina	mg/dL	II ou ID	58	270,33	221,74	Sim	0,408
		DD	54	238,72	176,25		
Saturação da Transferrina	%	II ou ID	59	39,41	17,02	Sim	0,567
		DD	56	37,77	13,27		
Transferrina	mg/dL	II ou ID	54	326,74	59,29	Sim	0,564
		DD	53	320,17	58,19		
Haptoglobina	mg/dL	II ou ID	56	105,12	47,81	Sim	0,271
		DD	49	95,06	44,83		
Ceruloplasmina	mg/dL	II ou ID	54	37,48	14,31	Não	0,257
		DD	52	34,98	7,31		
Glicemia	mg/dL	II ou ID	57	97,40	35,26	Sim	0,624
		DD	57	94,39	30,02		
Insulina	mU/mL	II ou ID	57	16,75	16,39	Sim	0,917
		DD	52	16,32	26,27		
Homa	mU/mL.mg/dL	II ou ID	47	0,94	2,93	Não	0,056
		DD	51	0,10	0,45		
Péptido C	ng/mL	II ou ID	57	2,40	2,30	Sim	0,924
		DD	52	2,44	1,68		
Atividade ECA	U/L	II ou ID	22	17,51	5,78	Sim	0,031
		DD	27	21,27	5,95		

* Teste de Levene para igualdade de variâncias

** Teste T para amostras independentes

Anexo 4

Tabela Suplementar 8.3 - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) com os genótipos (AC ou CC versus AA) do gene AGTR1 na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	AGTR1 A1166C	N	Média	Desvio Padrão	Variâncias iguais assumidas*	ρ^{**}
Idade	Anos	AC ou CC	55	54,96	11,02	Sim	0,520
		AA	59	53,53	12,64		
IMC	Kg/m ²	AC ou CC	50	25,50	4,27	Sim	0,720
		AA	55	26,05	9,94		
RNA	UI/mL	AC ou CC	55	2,51E+06	4,97E+06	Sim	0,478
		AA	59	2,00E+06	2,38E+06		
Plaquetas	U/mm ³	AC ou CC	55	2,09E+05	8,41E+04	Sim	0,361
		AA	59	1,96E+05	6,69E+04		
Fosfatase Alcalina	UI/mL	AC ou CC	54	80,52	30,56	Sim	0,845
		AA	60	79,25	37,65		
AST	UL/mL	AC ou CC	55	57,53	29,64	Sim	0,703
		AA	60	55,27	33,46		
ALT	UL/mL	AC ou CC	55	71,55	43,33	Sim	0,756
		AA	60	74,48	56,23		
GAMA GT	UL/mL	AC ou CC	55	87,80	94,67	Sim	0,541
		AA	60	77,73	81,21		
Coolesterol total	mmol/L	AC ou CC	55	4,32	0,96	Sim	0,596
		AA	58	4,41	0,88		
HDL	mmol/L	AC ou CC	54	1,55	0,58	Sim	0,655
		AA	57	1,60	0,66		
LDL	mmol/L	AC ou CC	53	2,31	0,78	Sim	0,113
		AA	55	2,56	0,83		
Triglicéridos	mmol/L	AC ou CC	55	1,11	0,42	Não	0,415
		AA	59	1,20	0,74		
APOA1	g/L	AC ou CC	53	3,77	16,00	Sim	0,805
		AA	55	4,71	22,98		
Ferro	mg/dL	AC ou CC	55	130,60	51,80	Sim	0,374
		AA	57	122,66	41,96		
Ferritina	mg/dL	AC ou CC	55	260,12	208,97	Sim	0,796
		AA	57	250,23	194,39		
Saturação da Transferrina	%	AC ou CC	56	40,07	16,90	Sim	0,319
		AA	59	37,22	13,54		
Transferrina	mg/dL	AC ou CC	54	322,58	54,58	Sim	0,872
		AA	53	324,41	62,87		
Haptoglobina	mg/dL	AC ou CC	51	100,78	44,86	Sim	0,939
		AA	54	100,08	48,41		
Ceruloplasmina	mg/dL	AC ou CC	52	36,75	11,10	Sim	0,665
		AA	54	35,78	11,84		
Glicemia	mg/dL	AC ou CC	55	94,71	28,36	Sim	0,710
		AA	59	97,00	36,38		
Insulina	mU/mL	AC ou CC	52	13,46	10,43	Não	0,143
		AA	57	19,35	27,95		
Homa	mU/mL.mg/dL	AC ou CC	49	0,45	1,60	Sim	0,788
		AA	49	0,56	2,50		
Péptido C	ng/mL	AC ou CC	53	2,41	1,76	Sim	0,960
		AA	56	2,43	2,26		
Atividade ECA	U/L	AC ou CC	23	19,16	6,64	Sim	0,653
		AA	26	19,95	5,72		

* Teste de Levene para igualdade de variâncias

** Teste T para amostras independentes

Anexo 5

Tabela Suplementar 8.4 - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) com os genótipos (CT ou TT versus CC) do polimorfismo AGT T174M na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos	Unidades de Medida	AGT T174M	N	Média	Desvio Padrão	Variâncias iguais assumidas*	ρ^{**}
Idade	Anos	CT ou TT	27	53,78	9,64	Sim	0,826
		CC	87	54,36	12,51		
IMC	Kg/m ²	CT ou TT	27	24,35	4,12	Sim	0,266
		CC	78	26,28	8,62		
RNA	UI/mL	CT ou TT	28	2,18E+06	2,83E+06	Sim	0,916
		CC	86	2,27E+06	4,13E+06		
Plaquetas	U/mm ³	CT ou TT	28	2,09E+05	7,86E+04	Sim	0,562
		CC	86	1,99E+05	7,50E+04		
Fosfatase Alcalina	UI/mL	CT ou TT	28	82,29	25,34	Sim	0,668
		CC	86	79,06	36,88		
AST	UL/mL	CT ou TT	28	49,86	24,70	Sim	0,212
		CC	87	58,44	33,34		
ALT	UL/mL	CT ou TT	28	66,25	46,01	Sim	0,411
		CC	87	75,28	51,63		
GAMA GT	UL/mL	CT ou TT	28	59,00	37,46	Não	0,015
		CC	87	90,13	97,50		
Colesterol total	mmol/L	CT ou TT	28	4,41	0,72	Sim	0,758
		CC	85	4,35	0,98		
HDL	mmol/L	CT ou TT	27	1,46	0,74	Sim	0,266
		CC	84	1,61	0,58		
LDL	mmol/L	CT ou TT	26	2,48	0,72	Sim	0,735
		CC	82	2,42	0,84		
Triglicéridos	mmol/L	CT ou TT	28	1,32	0,83	Sim	0,100
		CC	86	1,11	0,50		
APOA1	g/L	CT ou TT	26	8,03	33,44	Não	0,464
		CC	82	3,05	12,86		
Ferro	mg/dL	CT ou TT	26	128,65	58,23	Sim	0,796
		CC	86	125,92	43,43		
Ferritina	mg/dL	CT ou TT	26	221,48	133,36	Sim	0,332
		CC	86	265,25	216,77		
Saturação da Transferrina	%	CT ou TT	25	37,72	18,72	Sim	0,744
		CC	90	38,86	14,27		
Transferrina	mg/dL	CT ou TT	25	345,04	40,44	Não	0,010
		CC	82	316,92	61,77		
Haptoglobina	mg/dL	CT ou TT	26	114,08	51,71	Sim	0,084
		CC	79	95,93	44,08		
Ceruloplasmina	mg/dL	CT ou TT	26	37,35	8,00	Sim	0,578
		CC	80	35,90	12,37		
Glicemia	mg/dL	CT ou TT	28	95,11	21,10	Sim	0,884
		CC	86	96,15	35,69		
Insulina	mU/mL	CT ou TT	27	13,26	7,32	Sim	0,365
		CC	82	17,62	24,46		
Homa	mU/mL.mg/dL	CT ou TT	27	0,21	0,65	Sim	0,387
		CC	71	0,62	2,42		
Péptido C	ng/mL	CT ou TT	26	2,94	2,24	Sim	0,134
		CC	83	2,26	1,94		
Atividade ECA	U/L	CT ou TT	10	17,33	5,45	Sim	0,195
		CC	39	20,16	6,21		

*Teste de Levene para igualdade de variâncias

** Teste T para amostras independentes

Anexo 6

Tabela Suplementar 8.5 - Avaliação da relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) com os genótipos (GA ou AA versus GG) do polimorfismo AGT AT-6G/A na população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/Bioquímicos	Unidades de Medida	AGT AT-6G/A	N	Média	Desvio Padrão	Variâncias iguais assumidas*	ρ^{**}
Idade	Anos	GA ou AA GG	77 37	53,38 55,97	10,93 13,58	Não	0,314
IMC	Kg/m ²	GA ou AA GG	73 32	25,69 26,02	8,91 4,09	Sim	0,841
RNA	UI/mL	GA ou AA GG	78 36	2,39E+06 1,93E+06	4,30E+06 2,60E+06	Sim	0,551
Plaquetas	U/mm ³	GA ou AA GG	78 36	2,06E+05 1,93E+05	7,86E+04 6,90E+04	Sim	0,421
Fosfatase Alcalina	UI/mL	GA ou AA GG	77 37	77,22 85,32	25,75 47,48	Não	0,336
AST	UL/mL	GA ou AA GG	78 37	52,82 63,78	27,12 38,72	Sim	0,082
ALT	UL/mL	GA ou AA GG	78 37	68,60 82,51	42,07 63,90	Sim	0,167
GAMA GT	UL/mL	GA ou AA GG	78 37	76,83 94,59	78,47 104,60	Sim	0,312
Colesterol total	mmol/L	GA ou AA GG	77 36	4,35 4,41	0,93 0,90	Sim	0,744
HDL	mmol/L	GA ou AA GG	75 36	1,60 1,52	0,66 0,55	Sim	0,539
LDL	mmol/L	GA ou AA GG	73 35	2,41 2,49	0,86 0,72	Sim	0,613
Triglicéridos	mmol/L	GA ou AA GG	78 36	1,18 1,10	0,67 0,43	Sim	0,498
APOA1	g/L	GA ou AA GG	74 34	3,88 5,05	19,81 19,96	Sim	0,778
Ferro	mg/dL	GA ou AA GG	75 37	127,28 125,08	41,31 57,47	Não	0,836
Ferritina	mg/dL	GA ou AA GG	75 37	262,12 240,84	202,36 199,69	Sim	0,600
Saturação da Transferrina	%	GA ou AA GG	77 38	38,27 39,29	12,62 19,76	Não	0,773
Transferrina	mg/dL	GA ou AA GG	71 36	320,89 328,62	58,33 59,51	Sim	0,522
Haptoglobina	mg/dL	GA ou AA GG	72 33	100,26 100,79	42,95 54,15	Sim	0,957
Ceruloplasmina	mg/dL	GA ou AA GG	72 34	36,09 36,62	11,36 11,76	Sim	0,824
Glicemia	mg/dL	GA ou AA GG	77 37	92,31 103,35	26,45 42,20	Sim	0,091
Insulina	mU/mL	GA ou AA GG	76 33	17,04 15,39	24,60 12,24	Sim	0,715
Homa	mU/mL.mg/dL	GA ou AA GG	68 30	0,54 0,42	2,30 1,54	Sim	0,805
Péptido C	ng/mL	GA ou AA GG	75 34	2,51 2,24	2,21 1,56	Sim	0,526
Atividade ECA	U/L	GA ou AA GG	36 13	18,89 21,48	5,62 7,21	Sim	0,195

* Teste de Levene para igualdade de variâncias

** Teste T para amostras independentes

Anexo 7

Tabela Suplementar 8.6 - Correlação de Pearson entre parâmetros antropométricos, sociodemográficos e bioquímicos estudados (variáveis contínuas) para a população com HCC.

Parâmetros Antropométricos/ Bioquímicos		Idade	IMC	RNA	Plaquetas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	GAMA GT	Colesterol total	HDL	LDL	Triglicéridos	APOA1	Ferro	Ferritina	Saturação	Transferrina	Haptoglobina	Ceruloplasmina	Glicemia	Insulina	Homa	Péptido C	Atividade ECA	
		C. de Pearson	ρ	N	C. de Pearson	ρ	N	C. de Pearson	ρ	N	C. de Pearson	ρ	N	C. de Pearson	ρ	N	C. de Pearson	ρ	N	C. de Pearson	ρ	N	C. de Pearson	ρ	N	C. de Pearson
Idade	C. de Pearson	1,000	0,030	-0,067	-0,180	0,065	0,238**	-0,009	-0,035	-0,016	-0,139	0,080	0,130	0,044	0,098	0,079	0,024	-0,013	-0,072	0,088	0,068	0,177	-0,114	0,287**	0,078	
	ρ		0,764	0,481	0,057	0,496	0,011	0,926	0,714	0,866	0,147	0,411	0,168	0,650	0,306	0,408	0,805	0,896	0,468	0,373	0,477	0,067	0,265	0,003	0,608	
	N		114	104	113	113	113	114	114	114	112	110	107	113	107	112	112	109	107	105	105	113	108	98	108	46
IMC	C. de Pearson		1,000	-0,008	-0,134	0,024	0,173	0,138	0,505**	0,019	-0,168	0,048	0,034	-0,016	0,023	0,071	-0,051	-0,112	-0,034	-0,099	0,108	0,131	0,081	0,144	-0,143	
	ρ			0,932	0,176	0,807	0,077	0,161	0,000	0,853	0,094	0,641	0,732	0,875	0,817	0,479	0,612	0,268	0,742	0,335	0,275	0,196	0,443	0,155	0,354	
	N			105	104	104	105	105	105	103	101	98	104	98	102	102	100	99	96	97	104	99	93	99	44	
RNA	C. de Pearson			1,000	0,172	0,045	-0,040	-0,024	0,356**	-0,056	-0,049	-0,120	-0,021	-0,063	0,005	0,060	-0,014	0,081	0,209*	0,026	-0,038	-0,015	-0,005	-0,001	0,041	
	ρ				0,068	0,637	0,672	0,804	0,000	0,557	0,610	0,220	0,826	0,520	0,955	0,529	0,882	0,407	0,033	0,794	0,688	0,875	0,961	0,993	0,789	
	N				114	113	113	114	114	114	112	110	107	113	107	111	111	108	106	104	105	113	108	97	108	45
Plaquetas	C. de Pearson				1,000	-0,148	-0,409**	-0,304**	-0,020	0,186*	0,015	0,100	0,007	-0,114	-0,238*	-0,193*	-0,160	0,039	0,394**	0,025	-0,092	-0,147	0,103	0,041	-0,126	
	ρ					0,116	0,000	0,001	0,829	0,050	0,875	0,308	0,944	0,242	0,012	0,042	0,098	0,691	0,000	0,802	0,331	0,130	0,312	0,671	0,403	
	N					114	113	114	114	112	110	107	113	107	111	111	108	106	104	105	113	108	98	108	46	
Fosfatase Alcalina	C. de Pearson					1,000	-0,338**	-0,394**	-0,417**	-0,205*	-0,127	-0,131	0,018	-0,017	-0,117	-0,054	-0,122	0,190	0,093	0,286**	0,371**	0,023	0,015	0,092	0,146	
	ρ						0,000	0,000	0,000	0,030	0,187	0,179	0,846	0,858	0,223	0,576	0,210	0,051	0,350	0,003	0,000	0,814	0,886	0,343	0,333	
	N						114	114	114	114	112	110	107	113	107	111	111	108	106	104	105	113	108	97	108	46
AST	C. de Pearson						1,000	0,752**	0,413**	0,298**	-0,107	-0,036	-0,070	0,179	0,147	0,058	0,239*	0,216*	0,113	0,239*	0,182	0,127	0,066	-0,154		
	ρ							0,000	0,000	0,001	0,040	0,272	0,702	0,471	0,059	0,122	0,550	0,013	0,027	0,248	0,010	0,058	0,214	0,495	0,307	
	N							115	115	113	111	108	114	108	112	112	109	107	105	106	114	109	98	109	46	
ALT	C. de Pearson							1,000	0,378**	-0,097	-0,219*	0,033	-0,076	-0,140	0,169	0,252**	0,099	0,064	-0,084	0,006	0,413**	0,053	0,118	-0,019	-0,165	
	ρ								0,000	0,305	0,021	0,732	0,419	0,149	0,075	0,007	0,307	0,515	0,397	0,954	0,000	0,588	0,248	0,841	0,273	
	N								115	115	113	111	108	114	108	112	112	109	107	105	106	114	109	98	109	46
GAMA GT	C. de Pearson								1,000	-0,119	-0,141	-0,078	0,039	-0,063	0,036	0,084	-0,059	0,091	0,009	0,033	0,211*	0,064	0,253*	0,160	-0,092	
	ρ									0,211	0,140	0,420	0,681	0,516	0,706	0,377	0,542	0,353	0,929	0,736	0,024	0,506	0,012	0,096	0,542	
	N									115	113	111	108	114	108	112	112	109	107	105	106	114	109	98	109	46
Colesterol total	C. de Pearson									1,000	0,227**	0,701**	0,105	-0,038	-0,103	-0,023	-0,178	-0,023	0,136	-0,062	0,022	-0,047	0,115	-0,021	0,012	
	ρ										0,017	0,000	0,267	0,698	0,285	0,811	0,067	0,818	0,170	0,530	0,814	0,632	0,260	0,828	0,934	
	N										113	110	107	113	106	110	110	107	105	103	104	112	107	97	107	46
HDL	C. de Pearson										1,000	0,061	-0,072	-0,074	-0,065	-0,161	-0,098	0,083	0,089	0,065	-0,103	0,018	0,144	-0,277**	0,036	
	ρ											0,533	0,451	0,456	0,506	0,096	0,322	0,404	0,374	0,516	0,282	0,854	0,164	0,004	0,814	
	N											111	108	111	104	108	108	105	103	102	102	110	105	95	105	44
LDL	C. de Pearson											1,000	-0,083	-0,028	-0,015	-0,002	-0,016	-0,167	0,096	-0,143	0,204*	-0,141	-0,062	-0,056	-0,054	
	ρ												0,392	0,777	0,878	0,988	0,875	0,097	0,340	0,156	0,035	0,157	0,560	0,375	0,736	
	N												108	108	102	105	105	102	100	100	100	107	102	92	102	42
Triglicéridos	C. de Pearson												1,000	0,029	-0,045	0,022	-0,133	0,293**	0,056	0,000	0,112	0,296**	0,143	0,349**	-0,045	
	ρ													0,765	0,639	0,817	0,170	0,002	0,569	0,999	0,240	0,002	0,159	0,000	0,765	
	N													114	107	111	111	108	106	104	105	113	108	98	108	46
APOA1	C. de Pearson													1,000	-0,027	0,038	-0,081	0,176	-0,124	-0,063	-0,044	-0,006	0,479**	0,731*	-0,039	
	ρ														0,784	0,701	0,416	0,077	0,210	0,521	0,656	0,953	0,000	0,017	0,806	
	N														108	106	106	102	101	104	106	107	106	91	106	43
Ferro	C. de Pearson														1,000	-0,452**	-0,917**	-0,184	-0,298**	-0,260**	-0,061	-0,026	-0,090	0,052	0,129	
	ρ															0,000	0,000	0,057	0,002	0,008	0,524	0,391	0,384	0,595	0,395	
	N															112	112	108	107	104	104	111	107	96	107	46
Ferritina	C. de Pearson															1,000	-0,474**	-0,177	-0,064	-0,230*	-0,032	-0,045	0,024	0,020	-0,048	
	ρ																0,000	0,068	0,519	0,019	0,740	0,645	0,813	0,837	0,752	
	N																112	108	107	104	104	111	107	96	107	46
Saturação	C. de Pearson																1,000	-0,404**	-0,238*	-0,295**	-0,092	-0,056	-0,109	0,024	0,127	
	ρ																	0,000	0,017	0,003	0,345	0,577	0,291	0,808	0,395	
	N																	115	107	100	100	108	103	95	103	47
Transferrina	C. de Pearson																	1,000	-0,014	0,151	-0,008	0,136	0,164	0,089	0,043	
	ρ																		0,894	0,133	0,931	0,174	0,115	0,372	0,781	
	N																		107	100	106	102	93	102	45	
Haptoglobina	C. de Pearson																		1,000	0,229*	0,100	-0,145	-0,175	0,004	-0,187	
	ρ																			0,020	0,312	0,143	0,101	0,966	0,248	
	N																									